

Aussagekraft der histopathologischen Beurteilung in der Diagnostik der Osteomyelitis
mit dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) - Vergleich mit
mikrobiologischem und klinischem Befund

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Steffen Langwald

geboren am 19.10.1966 in Köthen

Gutachter:

- | | |
|--------------------------------------|---|
| 1. Prof. Dr. Dr. Gunther O. Hofmann, | Universitätsklinikum Jena
BG Klinikum Bergmannstrost Halle |
| 2. Prof. Dr. Andreas H. Tiemann, | SRH Zentralklinikum Suhl |
| 3. Prof. Dr. Volker Bühren, | BG Unfallklinik Murnau |
| Tag der öffentlichen Verteidigung: | 30. Januar 2018 |

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung	1
1. Einleitung	4
1.1. Definition	4
1.2. Epidemiologie	4
1.3. Einteilung und Klassifikation	4
1.4. Diagnostik und Therapie der Osteomyelitis	7
1.5. Osteomyelitis-Diagnose-Score (ODS)	10
1.6. Histopathologischer Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) ...	11
2. Zielsetzung der Arbeit	13
3. Material und Methoden	15
3.1. Patientenkollektiv	15
3.2. Diagnostikverfahren	16
3.2.1. Anamnese	17
3.2.2. Klinischer Befund	17
3.2.3. Makroskopischer intraoperativer Befund	17
3.2.4. Labor	19
3.2.5. Bildgebende Diagnostik	20
3.2.6. Mikrobiologie	21
3.2.7. Histopathologie	24
3.2.8. Histopathologische Kriterien in der Osteomyelitis-Diagnostik ...	26
3.3. Einordnung der histopathologischen Befunde in den Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES)..	28
3.4. Falsch negative und falsch positive mikrobiologische Befunde	31
3.5. Datensatz und Datenschutz	31
3.6. Statistische Auswertung	31

	Seite
4. Ergebnisse	32
4.1. Beschreibung der Daten	32
4.2. Hypothesen	35
4.2.1. Hypothese 1	35
4.2.1.1. Gesamtfallkollektiv	35
4.2.1.2. Zuordnung nach implantat- oder endoprothesenassoziiertem Auftreten	40
4.2.1.3. Zuordnung nach Altersgruppen	40
4.2.2. Hypothese 2	44
4.2.2.1. Übereinstimmung mikrobiologische Befunde mit dem HOES ...	44
4.2.2.2. Zusammenhang Anzahl der Erregernachweise und Infektstadium nach HOES	45
4.2.2.3. Falsch negative und falsch positive Erregernachweise	46
4.2.3. Hypothese 3	48
4.2.3.1. Übereinstimmung mikrobiologische Befunde mit dem klinischen Befund	48
4.2.3.2. Zusammenhang Anzahl der Erregernachweise und des Infektstadiums nach klinischem Befund	49
4.2.3.3. Falsch negative und falsch positive Erregernachweise	50
4.2.4. Hypothese 4	52
4.2.5. Hypothese 5	53
4.2.6. Hypothese 6	58
4.2.7. Hypothese 7	58
5. Diskussion	61
5.1. Akute und chronische Osteomyelitis	61
5.2. Labordiagnostik	62
5.3. Mikrobiologie	63
5.4. Einschätzung der Pathogenität	64
5.5. Falsch negative und falsch positive Befunde	66
5.6. Biofilm	69
5.7. SmallColony Variants	70
5.8. Klinischer Befund	71

5.9.	Vergleich mit den Ergebnissen der Untersuchung aus dem Jahr 2014.	73 Seite
6.	Schlussfolgerungen	74
7.	Anhang	75
7.1.	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	75
7.2.	Datensatzstruktur	79
7.3.	Literaturverzeichnis	81
7.4.	Lebenslauf	88
7.5.	Ehrenwörtliche Erklärung	89
7.6.	Danksagung	90

Abkürzungsverzeichnis:

ANOVA	analysis of variance
BD	Becton, Dickens and Company
BG	Berufsgenossenschaft
CD15	3-Fucosyl-N-acetyl-lactosamin
CRP	C-reaktives Protein
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
E. faecalis	Enterococcus faecalis
FISH	Floureszenz-in-situ-Hybridisierung
HCl	Salzsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HOES	Histopathologischer Osteomyelitis-Evaluationsscore
MHK	Minimale Hemm-Konzentration
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
ODS	Osteomyelitis-Diagnose-Score
P	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert
PAS-Reaktion	Periodic Acid Schiff Reaktion
paVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
PET-CT	Hybridverfahren aus PET und –Computertomografie
Rö	Röntgen
rs	Spearman Korrelationskoeffizient (rho)
S.aureus	Staphylococcus aureus
S.epidermidis	Staphylococcus epidermidis
SCV	Small Colony Variant
SIRS	systemic inflammatory response syndrome

Zusammenfassung

Es existiert eine Reihe von Problemen in der Diagnostik bakterieller Infektionen, die durch die mikrobiologische Untersuchung nicht adäquat zu lösen sind.

Jedes Stadium der Entzündungsreaktion wird durch charakteristische Zellpopulationen und Veränderungen am Knochen und den umgebenden Weichteilen repräsentiert. Dies gestattet eine histopathologisch objektivierte Zuordnung zur entsprechenden Erkrankungsphase der Osteomyelitis.

Mit der Etablierung des Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscores (HOES) im Jahr 2014 wurde erstmals eine Auswertbarkeit der verschiedenen Osteomyelitisstadien im Vergleich mit entsprechenden klinischen, paraklinischen und mikrobiologischen Befunden möglich.

Die vorliegende Arbeit untersucht an 491 Fällen mithilfe des HOES die Übereinstimmung der histopathologischen Einschätzung mit den Ergebnissen der mikrobiologischen und Labordiagnostik, vor allem aber mit der klinischen Beurteilung anhand des makroskopischen intraoperativen Befundes.

Zur Überprüfung der Unabhängigkeit der Befundgruppen und der Signifikanz erfolgte die Berechnung der Spearman Rangkorrelation und eine eindimensionale Varianzanalyse (ANOVA). Wenn erforderlich, wurde eine Faktorenanalyse und Dimensionsreduktion der Variablen, für lineare Verteilungsfunktionen eine Regressionsanalyse durchgeführt. Festgelegt wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit α von 5% ($\alpha=0,05$).

Zeichen einer chronischen Osteomyelitis traten bereits nach einer Woche auf. Zeichen einer akuten Osteomyelitis traten von der 1. bis zur 6. Woche regelhaft, danach nur noch selten auf. Möglicherweise bildet die Vorstellung, dass die chronische Osteomyelitis erst nach 4 bis 6 Wochen dem Stadium der akuten Osteomyelitis folgt, den tatsächlichen zeitlichen Verlauf nicht korrekt ab.

Sowohl das eingriffsbezogen bestimmte C-reaktive Protein als auch die Leukozytenzahl zeigen in der vorliegenden Arbeit eine proportional-lineare Verteilung ihrer Mittelwerte zur Akuität des Entzündungsprozesses ($R^2 > 0.9$; $P < 0,05$).

In 23% wurde *Staphylococcus aureus*, in 23% *Staphylococcus epidermidis* nachgewiesen, gefolgt von *Propionibacterium acnes* in 12% und *Enterococcus faecalis* in 8% der Fälle. Die mikrobiologischen Befunde stimmen mit der erwarteten Zuordnung nach dem HOES für die akute und floride Osteomyelitis zu 76%, für die Osteomyelitis ohne Infektanhalt zu 47% überein. Mit den makroskopischen intraoperativen Befunden stimmen sie für die akute und floride Osteomyelitis zu 79%, für die Osteomyelitis ohne Infektanhalt zu 46% überein. Die Rate der falsch negativen und falsch positiven mikrobiologischen Befunde liegt bei etwa 20%.

Es existiert ein Zusammenhang zwischen Pathogenität des Erregers und Akuität der Osteomyelitis. Die Verteilung der Erreger ist charakteristisch für den jeweiligen Pathogenitätsgrad. Die Zuordnung zu den Befundklassen nach dem HOES stützt die These von *Propionibacterium acnes* als im OP-Feld verbreiteten Kontaminanten.

Die Übereinstimmung der histopathologischen Einschätzung anhand des Histopathologischen Osteomyelitis Scores (HOES) mit der klinisch-makroskopischen Einschätzung ist hoch. Die Treffergenauigkeit (accuracy) in den korrespondierenden Gruppen beträgt im Mittel 72,5%. In den korrespondierenden Befundgruppen bestehen ein positiver Vorhersagewert von 53%, eine Sensitivität von 40% und eine Spezifität von 84% für die HOES-Gruppen. Für die klinischen Befundgruppen wurden ein positiver Vorhersagewert von 40%, eine Sensitivität von 53% und eine Spezifität von 77% errechnet. ($r_s = 0,581$, $P < 0,001$).

Die vorliegenden Daten bestätigen die Ergebnisse der Arbeit aus dem Jahr 2014.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen:

1. Nicht die Einzelbeurteilung, sondern die Kombination aus klinischer und histopathologischer Beurteilung führt zu einer sicheren Diagnosestellung.
2. Stimmen die histopathologische Einschätzung anhand des Histopathologischen Osteomyelitis Scores (HOES) und die klinisch-makroskopische Einschätzung

überein, ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 84% von einer richtigen Diagnosestellung auszugehen.

3. Der Histopathologische Osteomyelitis-Score (HOES) führt zu einer Objektivierung der Diagnosestellung.

1. Einleitung

Knochen- und Gelenkinfektionen gehören zu den schwersten Komplikationen in der traumatologisch-orthopädischen Praxis. Ihre Behandlung ist schwierig, langwierig und kostenintensiv und sie bedarf erheblicher Erfahrung der Behandler.

Zentral bei der Behandlung von Infektionen des Bewegungssystems ist ein tiefergehendes Verständnis der Diagnose Osteitis oder Osteomyelitis.

1.1. Definition

Als Osteitis bezeichnet man die erregerinduzierte Infektion des Knochens von außen nach innen, wobei Knochen und umgebende Weichteile eine Einheit bilden (Hofmann 2004). Daneben ist bei der Osteomyelitis die lokal invasive, meist posttraumatische oder postoperative direkte Infektion des Markraumes oder die hämatogene Streuung bei einliegendem Implantat der Ausgangspunkt einer Infektion.

Osteitis und Osteomyelitis unterscheiden sich also in der Ausbreitungsrichtung zentripetal oder zentrifugal (Tiemann 2011).

Im Spätstadium lassen sich Osteitis und Osteomyelitis nicht unterscheiden.

Im Weiteren soll hier der Einheitlichkeit halber der Begriff Osteomyelitis für beide Entitäten verwandt werden.

1.2. Epidemiologie

Nach Angaben des statistischen Bundesamtes waren 2012 ca. 17000 Patienten an einer Osteomyelitis erkrankt.

Die Osteomyelitis chronifiziert häufig. Geschieht dies, sind langwierige Verläufe von 1 bis 2 Jahren mit z.T. lebenslang wiederkehrenden, akuten Erkrankungsphasen die Folge. Nicht selten kommt es zu Defektsituationen der Knochen und Weichteile, die einer aufwändigen Rekonstruktion und langwierigen Rehabilitation bedürfen, mit erheblichen funktionellen Einbußen einhergehen können und häufig ein Ausscheiden aus dem Erwerbsleben bedeuten.

Für die akute Osteomyelitis geht man in Deutschland von ca. 1000 Neuerkrankungen im Jahr aus. Männer sind doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Sie tritt nach Elektiveingriffen in 0,1 bis 1,7% der Fälle, bei geschlossenen Frakturen in 1,0 bis 5%, bei offenen Frakturen sogar in bis zu 43% auf. Die Mehrkosten pro Fall betragen

durchschnittlich 14000 €, die kumulierten Gesamtkosten durchschnittlich 500.000 € pro Fall, d. h., es resultiert eine volkswirtschaftliche Belastung in der Größenordnung von 500.000.000 € pro Jahr für die akute Osteomyelitis.

Für die chronische Osteomyelitis liegt die jährliche Neuerkrankungsrate in Deutschland bei etwa 1500 Patienten. Betrachtet man die Krankheitskosten, Arbeitsausfallkosten und Kosten der Berentung, kumulieren hier ca. 700.000 € pro Fall, somit liegt der volkswirtschaftliche Schaden in Milliardenhöhe (Diefenbeck 2003).

Die Vermeidung der Chronifizierung der Osteomyelitis durch geeignete Therapieverfahren hat also neben der rein medizinischen eine nicht zu unterschätzende gesundheitsökonomische Dimension.

1.3. Einteilung und Klassifikation

Am bekanntesten sind die Klassifikationen von Waldvogel (1970) und die von Cierny und Mader (1985).

Waldvogel et al. unterscheiden 1970 die in Abb.1 dargestellte hämatogene Osteomyelitis, die aus einem unmittelbar angrenzenden Infektfokus entstandene, lokal fortgeleitete Osteomyelitis und die Osteomyelitis mit vaskulärer Insuffizienz, wobei sich letztere vorwiegend auf die nach heutiger Sicht eigenständige Entität des diabetischen Fußes bezieht (Waldvogel 1970). Aus der ätiologisch fokussierten, über viele Jahre führenden Waldvogel-Klassifikation lassen sich keine chirurgischen oder antibiotischen Therapiekonsequenzen ableiten (Mader 1997).

Waldvogel-Klassifikation 1970	
1	Hämatogene Osteomyelitis
2	Lokal fortgeleitete Osteomyelitis
3	Osteomyelitis mit peripherer Gefäßerkrankung (paVK und diab. Angiopathie)

Abb.1: Die Waldvogel-Klassifikation bezieht sich auf Ätiologie und die lokale Situation

Die von Cierny und Mader entwickelte Klassifikation stammt aus dem Jahr 1985 (Abb.2). Im *Stadium 1 (Markraumosteomyelitis)* beschränkt sich die Infektion auf den Markraum, *Stadium 2 (oberflächliche Osteomyelitis)* umfasst nur die durch Erregerinokulation oder kontinuierliche Infektausbreitung betroffene Kortikalis. Im *Stadium 3 (lokale Osteomyelitis)* sind sowohl Markraum als auch Kortikalis betroffen, die Stabilität des Knochens ist hierbei erhalten, welche im *Stadium 4 (diffuse Osteomyelitis)* mit Befall des gesamten Knochendurchmessers aufgehoben ist.

Der klinische Zustand des Patienten ist als A (ohne lokale oder systemische Risikofaktoren), B (lokale oder systemische oder lokale und systemische Risikofaktoren) oder C (inakzeptables Nutzen-Risiko-Verhältnis) gekennzeichnet (Cierny, Mader 1985). Hierbei stellt die Kategorie C definitionsgemäß keine objektiv evaluierbare Größe dar, außerdem gehen Parameter, wie Akuität, Alter des Patienten oder einliegendes Fremdmaterial, in die Cierny-Mader-Klassifikation nicht ein (Calhoun 2009).

Cierny-Mader-Klassifikation 1985	
Anatomische Lokalisation	
1	Markraumosteomyelitis
2	Oberflächliche Osteomyelitis
3	Lokale Osteomyelitis
4	Diffuse Osteomyelitis
Klinischer Zustand	
A	Keine Risikofaktoren
B	Lokale Risikofaktoren
	Systemische Risikofaktoren
	Lokale und systemische Risikofaktoren
C	Therapie belastender als Erkrankung

Hofmann schlägt 2004 in Anlehnung an tumorchirurgische Einteilungsprinzipien mit dem Begriff „Staging“ eine pathophysiologisch orientierte Einteilung der Osteomyelitis in 5 Stadien vor. Hier wird der Gedanke der möglichen Verbindung mit einem histopathologischen Grading zur ganzheitlichen Beschreibung der Osteomyelitis formuliert (Hofmann 2004).

Abb. 2: Die Klassifikation von Cierny und Mader beschreibt die knöcherne Situation anhand der anatomischen Lokalisation und schließt den klinischen Zustand des Patienten mit ein.

Im unfallchirurgisch-orthopädischen klinischen Alltag erfolgt überwiegend eine Einteilung nach dem zeitlichen Verlauf in akute und chronische Osteomyelitis, da sie Rückschlüsse auf die zu erwartende Klinik, mögliche Erreger und über Therapiemöglichkeiten zulässt (Borens 2016).

„Staging“ der Osteitis (Hofmann 2004)	
I	Latente Kontamination
II	Akute lokale Infektion
III	Generalisierte Bakteriämie
IV	Septische Metastasierung
V	Sepsis, SIRS (systemic inflammatory response syndrome)

Bis heute besteht keine Einigkeit in der Frage, wann eine akute Osteomyelitis tatsächlich chronifiziert. Trampuz und Zimmerli unterschieden 2008 in frühe (<2 Wochen), verzögerte (2 bis 10 Wochen) und chronische Osteomyelitis, Hofmann unterteilte 2004 nach

Abb. 3: Die Einteilung der chronischen Osteomyelitis nach Hofmann ist pathophysiologisch orientiert.

8 Wochen in akute und chronische Verlaufsform, wogegen andere Autoren bereits nach 4 Wochen von einer chronischen Osteomyelitis sprechen (Tiemann 2012).

Anhand der Klassifikation der Osteomyelitis wird bereits eine grundlegende, das gesamte Thema Osteomyelitis begleitende Problematik deutlich: Es existieren keine aktuellen, den heutigen Wissensstand abbildenden Klassifikationssysteme. Sie entstanden überwiegend in den 70er und 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts, aus ihnen lassen sich keine unmittelbaren Therapiekonsequenzen ableiten (Mader 1997), ein histopathologischer Bezug besteht nicht. Sie haben nur eingeschränkt Eingang in den medizinischen Alltag gefunden.

1.4. Diagnostik und Therapie der Osteomyelitis

Diagnostik der Osteomyelitis

Die Diagnostik der Osteomyelitis beruht auf folgenden Faktoren (Tiemann 2012):

1. Anamnese
2. Labor
3. Klinische Untersuchung
4. Bildgebende Diagnostik
5. Erregerdiagnostik
6. Feingewebliche Untersuchung

Die Anamnese gibt anhand des Zeitpunktes der Entstehung Hinweise auf die Akuität, arbeitet Prädispositionsfaktoren und wesentliche Komorbiditäten heraus und enthält so bereits richtungsweisende Informationen.

Eine gründliche klinische Untersuchung ist unverzichtbar. Die akute Osteomyelitis geht häufig mit den klassischen Entzündungszeichen Tumor, Rubor, Dolor, Calor und Functio laesa einher, kann aber gerade bei tiefliegenden Infekten nur gering ausgeprägt sein. Bei der chronischen Osteomyelitis ist das klinische Erscheinungsbild oft larviert, häufig ist der Schmerz das führende, viele Male auch das einzige Symptom.

In der Labordiagnostik sind Infektparameter, wie die Leukozytenzahl und das

C-reaktive Protein, etabliert. Hierbei ist nicht nur der absolute Wert, sondern auch der Verlauf von Belang.

Die Bildgebung dient der Detektion eines ossären oder weichteilassozierten Infektherdes, der Akuitätsbestimmung eines Befundes und der Bestimmung der Befundausdehnung zur präoperativen Planung (Planimetrie) (Braunschweig 2016).

Hierbei kommen die Projektionsradiographie, die Computertomographie, die Magnetresonanztomographie, die Sonographie und nuklearmedizinische Methoden, wie die Positronen-Emissions-Tomografie (PET) oder die PET- Computertomografie (PET-CT), zur Anwendung.

Der mikrobiologische Erregernachweis wird von den meisten Autoren nach wie vor als Goldstandard der Diagnostik angesehen. Da es sich bei der Erregerdiagnostik der Osteomyelitis oft um geringe Keimquantitäten, um im Biofilm oder als Small Colony Variants (SCV) vorkommende Erreger oder auch um die Diagnostik unter begleitender Antibiotikatherapie handelt, sind falsch positive und falsch negative Befundkonstellationen möglich. Eine sachgerechte Durchführung der Probenentnahme und -verarbeitung sind somit entscheidend für die Aussagekraft der mikrobiologischen Diagnostik.

Auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierte, molekulare Verfahren, der DNA-Nachweis über DNA-Mikroarray oder fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung – FISH) haben sich bislang nicht durchgesetzt. Sie sind technisch aufwändig und erlauben keine Aussage zur Vitalität und zum Resistenzverhalten. Die histopathologische Infektdiagnostik gestattet die Differenzierung der vorliegenden Infektsituation (akut, chronisch, spezifisch usw.), die Abgrenzung von malignen Prozessen, z. B. eines Fistelkarzinoms bei chronischer Osteomyelitis, und den Nachweis einer Osteomyelitis bei mikrobiologisch negativem Erregernachweis. Die direkte Erregertypisierung mittels Spezialfärbungen ist möglich, hat aber aufgrund ihrer geringen Spezifität eine untergeordnete Bedeutung (Krenn 2011).

Therapie der Osteomyelitis

Die Therapie der Osteomyelitis folgt klaren Prinzipien.

Sie fußt im Wesentlichen auf den Säulen:

1. Sanierung des Infektionsherdes
2. Weichteilrekonstruktion
3. Knöcherne Rekonstruktion

Leitlinien für die Therapie fehlen bislang. Wesentlich ist, wie lange die Infektion besteht, wie sich die Weichteilsituation darstellt und wie die Stabilität der Osteosynthese oder Prothese bewertet wird. Handelt es sich um einen Frühinfekt, die Grenze liegt hier bei 4 Wochen nach möglicher Keiminokulation, ist der Versuch des Erhalts einer Osteosynthese unter Wechsel des Osteosynthesematerials oder der Endoprothese unter Wechsel aller beweglichen oder Kunststoffanteile gerechtfertigt. Im Spätinfekt ist eine Osteosynthese oder Endoprothese in der Regel nicht zu erhalten.

In jedem Fall ist ein radikales Debridement, d.h. auch die Entfernung von infiziertem Knochen oder Weichteilstrukturen, erforderlich. Die Vorgehensweise ist mit der Radikalität in der Tumorchirurgie vergleichbar.

Häufig sind mehrere Eingriffe bis zur Infektberuhigung erforderlich. Dabei ist ein dynamisches Verständnis der Erkrankung Osteomyelitis erforderlich - in jeder Therapiephase und jedem Eingriff sind eine Bewertung des bisherigen Therapieerfolges und eine Neubewertung des Infektionsstatus möglichst objektiv erforderlich.

Die Diagnostik und der Therapieverlauf bei der Behandlung der Osteomyelitis sind in hohem Maße abgänglich von der persönlichen Expertise des Behandlers. Dieser ist konfrontiert mit einer Reihe von Fragen, für die bislang keine Leitlinien existieren: Handelt es sich überhaupt um eine Osteomyelitis? Gibt die unter laufender chirurgischer und antibiotischer Therapie erreichte Erregerfreiheit ausreichend Sicherheit für weitere Therapieentscheidungen? Wie sind möglicherweise falsch positive Befunde im Rahmen einer anstehenden Versorgung mit Endoprothesen oder anderen Implantaten zu werten? Bildet die makroskopische Einschätzung des

intraoperativen Befundes hinreichend den tatsächlichen Infektstatus ab? Wie ist der Therapieerfolg zu objektivieren?

1.5. Osteomyelitis-Diagnose-Score (ODS)

Zur sicheren Zuordnung einer Erkrankung als Osteomyelitis publizierten Schmidt et al. 2011 den Osteomyelitis–Diagnose-Score (ODS), der 5 Diagnoseverfahren erfasst: Anamnese und infektbahnende Faktoren, klinischer Befund und Labor, bildgebende Diagnostik, Bakteriologie, Histologie (siehe Abb.4). Diesen Verfahren werden zahlreiche gewichtete Einzelbefunde (0 bis 6 Punkte) addiert zugeordnet. In der Gesamtbewertung wird jeder der 5 Diagnoseparameter mit maximal 6 Punkten berücksichtigt. Mit mindestens 18 Punkten ist die Diagnose Osteomyelitis sicher (Diagnoseklasse A). Von 8 bis 17 Punkten ist die Diagnose wahrscheinlich (Diagnoseklasse B), bei 2 bis 7 Punkten ist sie möglich (Diagnoseklasse C).

Anamnese und infektbahnende Faktoren	Klinik/Labor	Bildgebende Diagnostik	Bakteriologie	Histologie	Summe/ Diagnoseklasse
0-6	0-6	0-6	0-6	0-6	A ≥18 Punkte
0-6	0-6	0-6	0-6	0-6	B 8-17 Punkte
0-6	0-6	0-6	0-6	0-6	C 2- 7 Punkte

Abb.4: Der Osteomyelitis–Diagnose-Score gestattet die Bewertung der Diagnosesicherheit für die Osteomyelitis in Diagnoseklassen A-C. Zum Erreichen der Diagnoseklasse A sind mindestens 3 Parameter erforderlich. (Schmidt 2011).

Die Definition anhand des ODS lässt keine Einteilung anhand der Ätiologie oder der Akuität zu. Der sehr differenzierte, aber aufwändige ODS hat keinen Eingang in die klinische Praxis finden können.

1.6. Histopathologischer Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES)

Die histopathologische Beurteilung in der Diagnostik der Osteomyelitis und in der Infektdiagnostik insgesamt hat in der unfallchirurgisch–orthopädischen Praxis einen oft noch unterschätzten Stellenwert (Krenn 2009).

Es existiert eine Reihe von Problemen in der Diagnostik bakterieller Infektionen, die durch die mikrobiologische Diagnostik nicht adäquat zu lösen sind. Die Diagnostik von minimalen bakteriellen Infektionen (sog. „low-grade-Infektionen“) sind ebenso wie falsch-negative und falsch-positive mikrobiologische Befunde ein Problemfeld, das sich mit zusätzlichen, histopathologisch definierten Kriterien lösen lässt (Krenn 2009).

Stellt der ODS aufgrund einer Fülle von Informationen die Diagnose Osteomyelitis mit entsprechender Wahrscheinlichkeit, kann durch das histopathologische Bild und den mikrobiologischen Befund bereits die Diagnose Osteomyelitis objektiviert werden.

Wesentlich für die Therapigestaltung und für die Einschätzung des Therapieerfolges ist die Bestimmung der Akuität des Prozesses, die histopathologisch möglich ist.

Für die akute Osteomyelitis typische Befunde sind Granulozyteninfiltrat, Nekrose und Ödembildung zur Beschreibung florider-destruierender Prozesse, wohingegen reaktive Knochenneubildung und Fibrose sowie Lymphozyten- und Makrophageninfiltrat reparative Prozesse bei der chronischen Osteomyelitis beschreiben.

Tiemann et al. publizierten 2014 den Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES), welcher in Anlehnung an das tumorchirurgische Einteilungsprinzip Grading eine histopathologisch standardisierte Einteilungssystematik der Osteomyelitis in 5 Diagnoseklassen vorschlägt (Tiemann 2014).

Histopathologischer Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES)	
1	Kein Anhalt für eine Osteomyelitis
2	Zeichen einer akuten Osteomyelitis
3	Zeichen einer chronisch floriden (also aktiven) Osteomyelitis
4	Zeichen einer chronischen Osteomyelitis
5	Zeichen einer abgelaufenen (beruhigten) Osteomyelitis
Abb.5: Die für die entsprechenden Erkrankungsphasen typischen Befunde werden entsprechend ihres Ausprägungsgrades (0-3) gewichtet. Das führt zur Einordnung in die entsprechenden Diagnoseklassen 1-5 (Tiemann et al. 2014).	

Der Histopathologische Osteomyelitis-Evaluationsscore ist ein vom Befundenden unabhängiges Werkzeug zur Beschreibung der Akuität in den jeweils untersuchten Gewebeabschnitten. Er gestattet eine Bewertung des Therapieerfolges und der Qualität der chirurgischen Herdsanierung und ist ein Mittel zur Beurteilung der Notwendigkeit weiterer operativer Maßnahmen.

2. Zielsetzung der Arbeit

In einer vorangegangenen Arbeit haben wir den Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) vorgeschlagen und die Kriterien und den histopathologischen Bewertungsmodus definiert (Tiemann 2014).

Mit der Etablierung des HOES steht eine histopathologisches Instrument zur Verfügung, mit welchem die Akuität der Osteomyelitis erstmalig standardisiert in einem Scoring-System abbildbar und somit eine Auswertbarkeit der verschiedenen Entitäten auch im Vergleich mit entsprechenden klinischen Befunden bzw. mikrobiologischen Befunden möglich wird.

Ziel der Arbeit ist:

1. Die Übereinstimmung der klinischen Einschätzung der Akuität der Osteomyelitis anhand des makroskopischen intraoperativen Befundes mit der histopathologischen Einteilung nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) zu analysieren.
2. Die Übereinstimmung der histopathologischen Einschätzung nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) und der klinischen Einschätzung anhand des intraoperativen Befundes mit dem Befund der mikrobiologischen Aufarbeitung zu analysieren.
3. Eine Aussage zu treffen, ob die histopathologische Beurteilung, insbesondere durch Anwendung des Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscores (HOES), zur Objektivierung der Einschätzung des Infektstatus und des Therapieerfolges beiträgt.
4. Die Ergebnisse aus der Untersuchung von 54 Fällen aus dem Jahr 2014 anhand einer größeren Fallzahl zu überprüfen.

Hierzu wurden die folgenden Hypothesen formuliert:

Hypothese 1:

Die histopathologische Zuordnung nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) stimmt mit der anhand des

makroskopischen intraoperativen Befundes gewonnenen Einschätzung überein.

Hypothese 2:

Die intraoperativ gewonnenen, mikrobiologischen Befunde stimmen mit der erwarteten Zuordnung nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) überein.

Hypothese 3:

Die intraoperativ gewonnenen, mikrobiologischen Befunde stimmen mit der erwarteten Zuordnung zu den makroskopischen intraoperativen Befunden überein.

Hypothese 4:

Mikrobiologischer Befund und klinische Einordnung anhand des makroskopischen intraoperativen Befundes weisen gemeinsam eine höhere Übereinstimmung mit der histopathologischen Einteilung nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) auf.

Hypothese 5:

Aus der Verteilung der nachgewiesenen Erreger in die histopathologischen Diagnoseklassen nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) lässt sich auf ihre Pathogenität schließen.

Hypothese 6:

Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Zuordnung nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) und der Höhe der Entzündungsparameter CRP und Leukozytenzahl.

Hypothese 7:

Anhand des Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) lässt sich der Zeitpunkt der Chronifizierung einer akuten Osteomyelitis bestimmen.

3. Material und Methoden

3.1. Patientenkollektiv

Betrachtet wurden 491 Operationen aus den Jahren 2013-2017. Operiert wurden 285 Patienten, davon 209 Männer und 76 Frauen. Alle Patienten wurden im BG-Klinikum Halle behandelt. Der jüngste Patient war zum Zeitpunkt der Operation 16 Jahre alt (zum Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie 18 Jahre), der älteste Patient 92 Jahre alt. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 57 Jahre.

Voraussetzung für die Aufnahme in die retrospektive Untersuchung waren:

- a) das Vorhandensein einer Osteomyelitis und das Vorliegen einer feingeweblichen Untersuchung des Knochens oder
- b) der Verdacht auf eine Osteomyelitis und das Vorliegen einer feingeweblichen Untersuchung des Knochens im Rahmen der Ausschlußdiagnostik.

Der bei weitem überwiegende Anteil der in dieser Studie betrachteten Operationen erfolgte an den unteren Extremitäten. Gemeinsam mit den untersuchten Eingriffen am Becken machen sie 87% aller Operationen aus. Dagegen machten Eingriffe am Thorax und den oberen Extremitäten 13 % aus. (Abb.6)

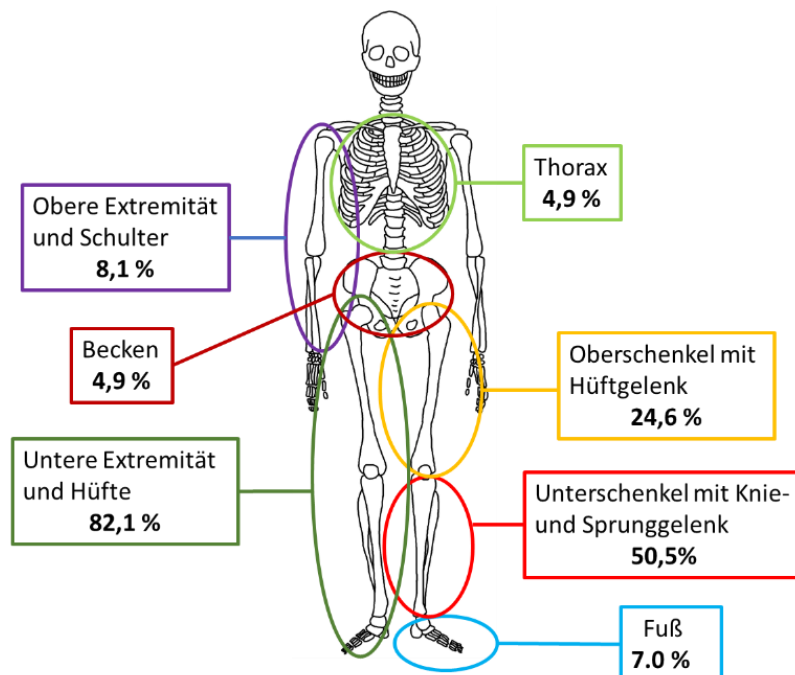


Abb. 6: Eingriffslokalisation prozentual

In 329 Fällen (176 Patienten) handelte es sich um eine implantatassoziierte Osteomyelitis, in 99 Fällen (63 Patienten) um eine endoprothesenassoziierte Osteomyelitis, in 61 Fällen (44 Patienten) bestand kein Bezug zu einem Implantat oder zu einer Endoprothese, in 2 Fällen bestätigte sich der Anfangsverdacht einer Osteomyelitis im Rahmen der Ausschlußdiagnostik nicht.

3.2. Diagnostikverfahren

Das Vorhandensein einer Osteomyelitis wurde nach den Diagnostikverfahren

1. Anamnese
2. Labor
3. Klinischer Befund
4. Bildgebende Diagnostik (Projektionsradiographie, Magnetresonanztomographie, Computertomographie, nuklearmedizinische und Hybridverfahren)
5. Erregerdiagnostik
6. Feingewebliche Untersuchung ermittelt.

Hiernach erfolgte die Einteilung der klinischen Diagnosen wie folgt:

Klinische Diagnose

- keine Osteomyelitis
- akute Osteomyelitis
- akute implantatassoziierte Osteomyelitis
- akute endoprothesenassoziierte Osteomyelitis
- chronische Osteomyelitis
- chronische implantatassoziierte Osteomyelitis
- chronische endoprothesenassoziierte Osteomyelitis
- exazerbierte chronische Osteomyelitis
- exazerbierte chronische implantatassoziierte Osteomyelitis
- exazerbierte chronische endoprothesenassoziierte Osteomyelitis.

Die Einteilung in Osteomyelitis, implantatassoziierte Osteomyelitis und endoprothesenassoziierte Osteomyelitis wurde nach folgenden Kriterien vorgenommen:

Osteomyelitis:

1. zu Behandlungsbeginn kein Implantat einliegend
2. ehemalige implantat- oder endoprothesenassoziierte Osteomyelitis mit über ein Jahr zurückliegender Implantatentfernung und zwischenzeitlich eingetretener Infektberuhigung

3. Osteomyelitis aufgrund einer Arthritis, einer fortgeleiteten Infektion oder hämatogenen Streuung in eine benachbarte oder weiter entfernte Lokalisation

implantat- oder endoprothesenassoziierte Osteomyelitis:

1. einliegendes Implantat oder einliegende Endoprothese zu Beginn der aktuellen Behandlung
2. bekannte implantat- oder endoprothesenassoziierte Osteomyelitis mit erfolgter Implantatentfernung ohne zwischenzeitliche klinische Infektberuhigung

Die klinische Diagnose blieb für jeden der 285 Patienten über den gesamten Behandlungszeitraum bestehen. Sie gestattet keine Rückschlüsse auf die den dynamischen Krankheitsverlauf beschreibende Prozeßgrößen, wie z.B. die Akuität. Diese können nur eingriffsbezogen generiert werden, weshalb im Zentrum der vorliegenden Untersuchung der einzelne Eingriff (insgesamt 491 Eingriffe) mit seinen Parametern steht.

3.2.1. Anamnese

Die Anamnese gibt anhand des Zeitpunktes des Infektbeginns Hinweise auf die Akuität, erfaßt das Vorhandensein einer bekannten Osteomyelitis und das Vorliegen von Implantaten oder Endoprothesen sowie wesentliche Prädispositionsfaktoren und Komorbiditäten.

3.2.2. Klinischer Befund

Die akute Osteomyelitis geht häufig mit den klassischen Entzündungszeichen Tumor, Rubor, Dolor, Calor und Functio laesa einher, kann aber gerade bei tiefliegenden Infekten nur gering ausgeprägt sein. Bei der chronischen Osteomyelitis ist das klinische Erscheinungsbild oft larviert, meistens ist der Schmerz das führende, oft genug auch das einzige Symptom. Eine gründliche klinische Untersuchung ist daher unverzichtbar und trägt wesentlich zur Diagnosefindung bei.

3.2.3. Makroskopischer intraoperativer Befund

Die Dynamik der Erkrankung Osteomyelitis, das Erkrankungsstadium, der Therapieverlauf und der Therapieerfolg können nur durch eine eingriffsbezogene Betrachtung abgebildet werden.

Der klinische makroskopische intraoperative Befund ist hierbei ein wesentlicher Faktor, der aber subjektiv geprägt und abhängig von der Erfahrung des jeweiligen Operators ist.

Makroskopisch zu beurteilen sind:

- akut-destruierende Prozesse (Nekrose, Pus),
- ein florides Geschehen (fortbestehendes Ödem, Fibrin, Granulationsgewebe),
- die Folgen der reparativen Prozesse (Fibrose, Narbenbildung, Ossifikationen).

Nicht zuzuordnen ist das Stadium der chronischen, niedrig floriden Entzündung, da für die histopathologischen Kriterien Makrophagen- und Lymphozyteninfiltration ein makroskopisch sichtbares Substrat fehlt: Es ist makroskopisch entweder floride oder infektberuhigt! Es ist makroskopisch entweder floride oder infektberuhigt!

Deshalb wurde auf eine Befundklasse „chronischer Infekt“ verzichtet und eine Einteilung in die folgenden 4 Gruppen vorgenommen:

1. akuter Infekt
2. chronisch florider Infekt
3. kein Infektanhalt, aber postentzündliche Veränderungen
4. kein Infektanhalt

Es erfolgte die standardisierte Erfassung des intraoperativen Befundes im „Begleitbogen septische Chirurgie“, welcher Bestandteil der Patientenakte ist (Abb.7).

Im „Begleitbogen septische Chirurgie“ wurden erfaßt:

1. Patientenangaben (Patientenetikett)
2. Operationsdatum
3. Operateur
4. intraoperativer makroskopischer
ossärer und Weichteilbefund
5. Angaben zum Vorhandensein eines
Implantates (in der Erstoperation)
6. Angaben zu Früh- oder Spätinfekt
7. aktuelle Diagnose
8. Weichteilbefund
9. Angaben zu Gelenkinfekt

OP-Begleitbogen septische Chirurgie

Pat. - Aufkleber

OP-Datum:

 Operateur:

☐ Histologie
 ☐ keine Histologie

Intraop. Befund

Knochen	Weichteile
<input type="checkbox"/> akuter Infekt	<input type="checkbox"/> akuter Infekt
<input type="checkbox"/> chronisch (florider) Infekt	<input type="checkbox"/> chronisch (florider) Infekt
<input type="checkbox"/> kein Infektanhalt	<input type="checkbox"/> kein Infektanhalt
<input type="checkbox"/> kein Infektanhalt - aber postentzündliche Residuen	<input type="checkbox"/> kein Infektanhalt - aber postentzündliche Residuen
<input type="checkbox"/> Implantat aktuell einliegend	

nur bei Erst-OP:

☐ implantatassoziiert
☐ Frühinfekt (< 4Wo)

☐ endoprothesenass.
☐ Spätinfekt (> 4Wo)

☐ nicht implantat-/endoprothesenass.

aktuelle Diagnose

☐ Akute OM (<4Wo)
☐ Infektberuhigte AOM

☐ Akut Exazerbierte Chronische OM
☐ Weichteilinfekt

☐ Chronische OM (>4Wo)
☐ Infektberuhigte COM

☐ Fistel
☐ Defekt
☐ ohne Fistel/WT-Defekt

☐ akuter Gelenkinfekt

☐ Gächter 1
☐ Gächter 2
☐ Gächter 3
☐ Gächter 4

Abb. 7: Der intraoperative makroskopische ossäre und Weichteilbefund wird im „Begleitbogen septische Chirurgie“ erfasst.

3.2.4. Labor

Standardisiert wurden die Leukozytenzahl und der CRP-Wert bestimmt und zur Beurteilung herangezogen. Hierbei schließt ein niedriger CRP-Wert eine chronische Osteomyelitis nicht aus. Generell ist hier der Einzelwert weniger aussagekräftig als der Verlauf, vor allem eine ausbleibende Normalisierung oder ein Wiederanstieg nach einem vorausgegangenen Abfall sind suspekt.

3.2.5. Bildgebende Diagnostik

Die Bildgebung dient der Detektion eines ossären oder weichteilassozierten Infektherdes, der Akuitätsbestimmung eines Befundes und der Bestimmung der Befundausdehnung zur präoperativen Planung (Planimetrie) (Braunschweig 2016).

Es kommen folgende Verfahren zur Anwendung:

- **Projektionsradiographie:** Aussagen zur Akuität können nicht getroffen werden. Zur Beurteilung eines frühen Infektes ist die Projektionsradiographie nicht geeignet. Bei chronisch-rezidivierenden Osteomyelitiden findet sich ein „buntes Bild“ aus destruktiven und reparativen ossären Prozessen. Zur Beurteilung einliegender Implantate oder Prothesen ist sie gut geeignet.
- **Magnetresonanztomographie (MRT):** Die Magnetresonanztomographie gestattet eine hervorragende Beurteilung der Weichteile und des Markraumes im Rahmen der Primärdiagnostik, nicht aber nach erfolgter operativer Intervention.
Sie läßt die Beurteilung der Akuität eines Befundes zu und ist somit bei der Diagnostik eines Fröhinfektes allen anderen Verfahren überlegen, chronische Osteomyelitiden ohne akute Komponente sind schwer beurteilbar. Zur kurzfristigen Verlaufsbeurteilung im Rahmen einer laufenden operativen Therapie ist sie nicht geeignet.
- **Computertomographie (CT):** Die Computertomographie gestattet eine hervorragende Beurteilung der knöchernen Situation. Paraossäre Abszesse können dargestellt werden, die Akuität ist nur eingeschränkt einzuschätzen. Die Ausdehnung eines Prozesses ist exakt beurteilbar. Zur Operationsplanung hat die Computertomographie dementsprechend einen hohen Stellenwert.
- **Positronen-Emissions-Tomographie mit Computertomographie (PET-CT):** Die PET-CT ist zur Diagnostik bei einliegendem Implantat hervorragend geeignet. Aufgrund der Detektion der Stoffwechselleistung ist sie zur Entzündungsdiagnostik oder zur Vitalitätsbeurteilung des Knochens geeignet. Für die vorliegende Arbeit wurden nuklearmedizinische Verfahren nur ausnahmsweise angewandt.

Die bildgebende Diagnostik erfolgt nach einem etablierten Algorithmus (Abb.8).

Untersuchungsschritte	Unbekannter Patient		Bekannter Patient
	<i>Osteitis ja / nein</i>		<i>Infektexazerbation</i>
Schritt 1	Projektionsradiographie: obligat Ziel: Orientierende Untersuchung	Schritt 1	Ro: fakultativ MRT: obligat Ziel: Beurteilung der Akuität
		Zwischenentscheidung	<i>Reevaluation: „Unklarer Befund“</i>
Schritt 2	MRT: regelhaft Ziel: Akuität, intramedullärer Infekt, Ausdehnung	Schritt 2	PET-CT: fakultativ
Schritt 3	CT: fakultativ Ziel: Planimetrie, Op - Planung	Schritt 3	CT: obligat Ziel: Planimetrie
Zwischenentscheidung	<i>Reevaluation: Befund eindeutig? – Diagnostik abgeschlossen WENN NEIN</i>		
Schritt 4	PET – CT: bei Bedarf (Implantat)		

Abb.8: Algorithmus der bildgebenden Diagnostik der Osteomyelitis (Braunschweig 2016)

CT	Computertomografie
MRT	Magnetresonanztomographie
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
PET-CT	Hybridverfahren aus PET und CT
Planimetrie	Bestimmung der Befundausdehnung

Die Bildgebung ist unverzichtbar in der Primärdiagnostik, zur Verlaufsbeurteilung und in der Beurteilung des Therapieerfolges insgesamt.

Eine regelmäßige und kurzfristige, eingriffsbezogene Beurteilung der Akuität der Osteomyelitis im Therapieverlauf ist aus methodischen Gründen (MRT) und aus Gründen des Strahlenschutzes (CT) nicht möglich.

3.2.6. Mikrobiologie

Probengewinnung

Die intraoperative Entnahme von Gewebeproben erfolgte an repräsentativen, nach makroskopischem intraoperativem Befund ausgewählten Lokalisationen, wobei im Regelfall mindestens 3 Biopate, möglichst vor Antibiotikaapplikation entnommen wurden. Punktate oder Abstriche wurden aufgrund der geringeren Sensitivität für die vorliegende Arbeit nicht verwandt.

Im Behandlungsverlauf wurden regelmäßig Eingriffe bei laufender Antibiotikatherapie durchgeführt und die dabei gewonnenen Gewebeproben entsprechend gekennzeichnet.

Die Gewebeproben wurden im Tagesverlauf maximal 3 Stunden nach Gewinnung in das unmittelbar im Klinikgebäude befindliche, mikrobiologische Labor transportiert, in den Abend- und Nachtstunden erfolgte die Lagerung bis zum nächsten Morgen bei Zimmertemperatur.

Probenbearbeitung

Die gewonnenen mikrobiologischen Proben wurden nach Eingang unverzüglich kultiviert. Die erforderliche Homogenisierung der Gewebeproben erfolgte unter kontrollierten, aseptischen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank HERASAFE® der Firma HERAEUS mit dem Einweg-Homogenisiersystem ULTRA-TURRAX® Tube Drive control IKA mit verschließbaren Probengefäßen.

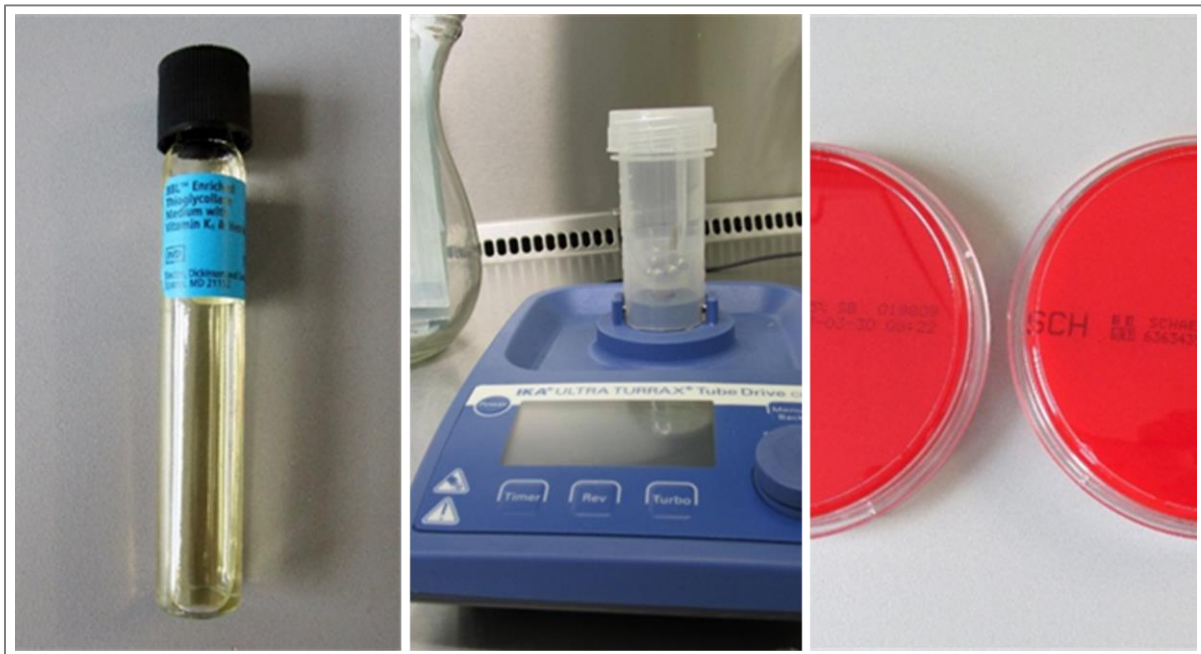


Abb.9: Mikrobiologische Diagnostik

Links: BBL Thioglycollate Bouillon-Medium, angereichert mit Vitamin K1 und Hämin

Mitte: Einweg-Homogenisier-system ULTRA-TURRAX® Tube Drive control

Rechts: BD Columbia Agar mit 5% Schafblut (Platte li.);

BD Schaedler-Agar mit Vitamin K1 und 5 % Schafblut (Platte re.)

Mit dem Untersuchungsgut wurden die folgenden Nährmedien beimpft:

1. BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood
(BD Columbia Agar mit 5% Schafblut; Erstisolierungs-Mehrzweckmedium)
2. BD Schaedler Agar with Vitamin K1 and 5% Sheep Blood

(BD Schaedler-Agar mit Vitamin K1 und 5 % Schafblut; Medium zur Isolierung und Kultivierung von anspruchsvollen, obligaten Anaerobiern)

3. BBL™ Thioglycollate Medium, Enriched (with Vitamin K1 and Hemin), with Calcium Carbonate L007510, Firma BD

(BBL Thioglycollate Medium, angereichert mit Vitamin K1 und Hämin; angereichertes Bouillonmedium für die Isolierung und Kultivierung von hochselektiven oder langsam wachsenden, obligaten Anaerobiern)

Zum Nachweis aerober Kulturen wurden BD Columbia Agarplatten in aerober Atmosphäre mit 3 bis 10 % CO₂ für 48 Stunden bei 35 ± 2°C in einem Brutschrank Kelvitron t der Firma Hereus inkubiert. Die Ergebnisse wurden nach 24 und 48 Stunden abgelesen.

Für die Isolierung von obligaten Anaerobiern wird für alle Proben die Verwendung von mindestens zwei Medien empfohlen.

Hierzu wurden BD Schaedler Agarplatten und als zweites Medium BBL Thioglycollate Bouillonmedium gemeinsam in einem anearoben System, dem „Anerobiertopf“ (s. Abb.10), in einem Brutschrank unter CO₂-Bedingungen bei 35 ± 2°C für insgesamt 14 Tage anaerob inkubiert und alle 3 bis 4 Tage abgelesen (Brutschrank Hera cell 150, Firma Hereus).

Die Bouillonkulturen wurden wenigstens eine Woche aufbewahrt, bevor sie als negativ entsorgt wurden. Im Falle einer Eintrübung der Bouillon z.B. im Enriched Thioglycollate Medium als Zeichen des Bakterienwachstums wurden Subkulturen auf anaeroben Agarmedien angelegt.

Die Resistenzbestimmung erfolgte mit dem Vitek-2-System der Firma bioMérieux über die automatisierte Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK).

Methodisch wurde durch Mikrodilution aus einer standardisierten Keimsuspension in NaCl eine AST-Karte mit 64 Kammern beladen. In einer Verdünnungsreihe wurde ermittelt, bei welcher Konzentration eines Antibiotikums kein Keimwachstum mehr auftritt. Hierbei wurden die Karten vollautomatisch inkubiert, abgelesen und die Daten in das Labor-System exportiert.



Abb. 10:
Kultivierung und
Resistenzbestimmung

Links: Kultivierung im
„Anaerobiertopf“ mit 2
Kulturmedien über 2
Wochen

Rechts:
Resistenzbestimmung
mittels Karte in
Mikrodilutions-technik
(System Vitek 2, Firma
bioMérieux)

3.2.7. Histopathologie

Die Detektion der neutrophilen Granulozyten und das infektionspathologische Substrat, also die typischen Gewebsveränderungen, stehen im Mittelpunkt der histopathologischen Infektionsdiagnostik.

Sie wurde mittels HE-Färbung, PAS-Reaktion, Chlorazetatesterase-Färbung sowie immunhistochemischer CD15-Detektion durchgeführt. Zudem erfolgten die Identifikation und Quantifizierung von immunhistochemisch detektierten, neutrophilen Granulozyten (CD15).

Eine direkte Keimtypisierung erfolgte nicht.

Probengewinnung

Es wurden intraoperativ knöcherne und Weichgewebsbioptate aus makroskopisch repräsentativen Lokalisationen gewonnen und zur histopathologischen Beurteilung in das Medizinische Versorgungszentrum für Histologie, Zytologie und Molekulare Diagnostik Trier, einem zertifizierten und akkreditierten histopathologischen Diagnosezentrum mit Schwerpunkt für Orthopädische Pathologie, übersandt. Der Qualitätsstandard entsprach der DIN ISO/IEC 17020.

Der Versand der verschlossenen Gewebeproben erfolgte mittels Kurierdienst in doppelten, gesicherten Behältern, fixiert in 4% gepufferter Formalinlösung.

Probenbearbeitung

Nach Eingang der formalinfixierten Gewebeproben erfolgte der Zuschnitt in eine repräsentative Weichgewebsfraktion (1.1.) und eine von Weichgewebe befreite Knochenfraktion (1.2.).

Knochenfragmente unter 3 cm Durchmesser wurden weiter fragmentiert und zu maximal 4 eingebetteten Proben verarbeitet.

Knochenresektate über 3 cm wurden mit einer Knochensäge in maximal 9, je 1 cm messende Gewebelöcke verarbeitet.

Die Knochengewebelöcke wurden in EDTA- oder HCl-Lösung im Volumenverhältnis 1:20 entkalkt. Die Entkalkungsdauer hing von der Gewebekonsistenz der spongiösen oder kortikalen Proben ab. Unter Raumtemperatur betrug die Inkubationsdauer für HCL-Lösung 1 bis 2 Tage, für EDTA-Lösung 3 bis 7 Tage. Es erfolgte die tägliche Kontrolle des Entkalkungsgrades anhand der Gewebekonsistenz.

Das Gewebe wurde in maximal 0,5 cm dicke Scheiben geschnitten. Im geschlossenen System (Peloris SOP 8204, Leica, Wetzlar) erfolgte die Entwässerung unter Vakuum und Wärme über eine aufsteigende Ethanolreihe und Xylol. Es folgten die Paraffineinbettung über Nacht und der Zuschnitt mittels Mikrotom (Rotationsmikrotom Hyrax M40, Zeiss; Messer A35, Feather). Die 1- bis 3-µm Schnitte wurden auf entfettete Objektträger aufgebracht (Objektträger Superfrost, Firma Menzel) und für 10 bis 15 Minuten bei 70 °C im Wärmeschrank (function line, Firma Heraeus) abgeschmolzen. Die Objektträger wurden in Xylol entparaffiniert und mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

HE-Färbung

Die HE-Färbung erfolgte vollautomatisch im Färbemodul Leica ST 4040.

Die Objektträger wurden durch Xylol und eine Ethanolreihe deparaffiniert und mit Leitungswasser gespült, dann folgte die Kernfärbung. Die Objektträger wurden viermal für 2 Minuten in Hämatoxylin (Hämatoxylin nach Harris, Firma Surgipath) eingetaucht. Hiernach wurden die Kerne für jeweils 2 Minuten in 70%igem Ethanol und 25%iger Salzsäure gebläut, gefolgt von erneutem Spülen mit Leitungswasser. Schließlich erfolgte die Hintergrundfärbung mit Eosin (Eosin Y, Firma Sigma-Aldrich) für insgesamt viermal 2 Minuten.

Danach wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Ethanolreihe geführt und dreimal für jeweils 2 Minuten in Xylol getaucht. Mit Hilfe eines Eindeckmittels (Fixogum

Fotokleber) wurde der Gewebeschnitt eingedeckt und ein Deckglas auf den Schnitt geklebt.

Immunhistochemische Darstellung von CD3-Lymphozyten

Die Darstellung von CD3-Lymphozyten erfolgte in einem vollautomatisierten Färbesystem (Benchmark XT). Durch gefärbte Antikörper wurden bestimmte zelluläre Strukturen sichtbar gemacht (Ramos-Vara und Miller 2014).

PAS-Färbung

Die PAS-Färbung wurde gleichfalls vollautomatisch im Leica ST4040 Färbemodul durchgeführt. Hierbei wurden glykogenhaltige Bereiche der Zellen rot gefärbt. Die Schnitte wurden mit Xylol behandelt und danach durch eine absteigende Ethanolreihe geführt und anschließend mit Hämalaun nach Mayer gefärbt, bevor in 96%igem Isopropanol die endgültige Fixierung erfolgte.

Berliner Blau-Reaktion und Öl-Rot-Färbung

Die Berliner Blau-Reaktion wurde vollautomatisch mit dem Leica ST 4040 Färbemodul, die Öl-Rot-Färbung manuell durchgeführt.

3.2.8. Histopathologische Kriterien in der Osteomyelitis-Diagnostik (Krenn 2012)

Muster der akuten Osteomyelitis

1. **Ossäre Veränderungen:** Knochennekrosen: Insbesondere in der EDTA-Entkalkung sind Knochentrabekel mit optisch leeren Osteozytenlakunen als Kriterium für nekrotisches Knochengewebe nachweisbar. Die Knochentrabekel sind irregulär konturiert und fragmentiert. Diese können frakturiert und vollständig nekrotisch vorliegen (sog. Knochensequester). Intramedullär bestehen Granulozyteninfiltrate und Fibrinexsudate. Bei Knochengeweben mit hämatopoetischer Funktion (z.B.: Axialskelett) besteht eine reduzierte bzw. vollständig fehlende Hämatopoese.
2. **Weichgewebe-Veränderungen:** Weichgewebnekrosen: Kriterien für Weichgewebnekrosen stellen Apoptosen, eine Gewebe-Eosinophilie, Fibrinexsudationen und eine verdämmernde Textur des Gewebes dar.

3. **Entzündliches Infiltratmuster:** Neutrophiles Granulozyteninfiltrat: Diffuse und gruppierte Lagerung (sog, Mikroabszesse, ≥ 5 Granulozyten) von segmentierten neutrophilen Granulozyten in den zumeist hochgradig ödematösen Markräumen. Die neutrophilen Granulozyten sind PAS-zytoplasmatisch-grobgranulär positiv, zeigen eine verplumpte, pyknotische Chromatintextur (Granulozytenapoptose bei Keimphagozytose und Nekrose). Immunhistochemisch besteht eine spezifische, intensive, grobgranuläre, überwiegend zytoplasmatische CD15-Positivität. Auf der irregulären Trabekeloberfläche sind neben neutrophilen Granulozyten auch Osteoklasten nachweisbar.

Muster der chronischen Osteomyelitis

1. **Ossäre Veränderungen:** Die reaktive Knochenneubildung ist gekennzeichnet durch irregulär konturierte Geflechtknochenformationen (polarisationsoptischer Nachweis von irregulär verlaufenden, kollagenen Fibrillen) mit Fibrose und Markraumfibrose im präexistenten spongiösen Knochengewebe sowie angrenzende Osteoblastenformationen und Granulationsgewebe.
2. **Weichgewebe-Veränderungen:** Es finden sich fibrosierende und granulierende Gewebsformationen. Das entzündliche Infiltrat besteht aus Plasmazellen, Lymphozyten und Makrophagen.
3. **Entzündliches Infiltratmuster:** Lymphozytäre/Makrophagen- und Plasmazellinfiltrate: In den hochgradig fibrosierten Markräumen finden sich lymphozyten- und makrophagenreiche, manchmal auch plasmazellreiche, gelegentlich fokale granulozytäre Infiltrate mit wenigen neutrophilen Granulozyten.

Histopathologische Kriterien der Osteomyelitis

Akute Osteomyelitis

- Infiltrat aus segmentierten neutrophilen Granulozyten
- Diffus oder gruppiertes entzündliches Infiltrat
- Markraumödem
- Reduzierte Hämatopoese
- Hyperämische Blutgefäße
- Fibrinpräzipitate
- Nekrotische Knochentrabekel mit Totenlade

Chronische Osteomyelitis

- Plasmazellreiches entzündliches Infiltrat
- Wenig neutrophile Granulozyten
- Markraumfibrose
- Reaktive Knochenneubildung

Abb. 11: Histopathologische Kriterien der Osteomyelitis (Krenn 2012)

3.3. Einordnung der histopathologischen Befunde in den Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES)

HOES-Kriterien:

Die Kriterien zur Eingruppierung entsprechen den 2014 in unserer Arbeit „Histopathologischer Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) – ein innovativer Ansatz zur histopathologischen Diagnostik und Kartierung der Osteomyelitis“ vorgestellten Kriterien (Tiemann 2014).

HOES: Tabellarische Form

Es erfolgt eine abgestufte semiquantitative (0, 1, 2, und 3) und eine additive Bewertung der Kriterien sowohl für die akute (A1 bis A3) als auch die chronische Osteomyelitis (C1 und C2).

semiquantitative Flächenbewertung der histopathologischen Muster:

Nicht vorhanden (= 0).

Leichtgradig (= 1) ein Drittel der Präparatfläche

Mäßiggradig (= 2) zwei Drittel der Präparatfläche

Schwergradig (= 3) drei Drittel, also die gesamte Präparatfläche

<u>HOES-Humaner Osteomyelitis-Score (Tabellarische Form)</u>		
A1 Knochen-Nekrose	0/1/2/3	(...)
A2 Weichgewebs-Nekrose	0/1/2/3	(...)
A3 Granulozyten-Infiltrat	0/1/2/3	(...)
C1 Knochenneubildung/Fibrose	0/1/2/3	(...)
C2 Lymphozyten-/Makrophagen-Infiltrat	0/1/2/3	(...)

Abb. 12: HOES-Tabellarische Form.

Nach Befundausprägung werden 0 bis 9 Punkte für die Kriterien „akut“ A(0-9) und 0 bis 6 Punkte für die Kriterien „chronisch“ C(0-6) vergeben.

Zuordnung von HOES-Score Werten und der schriftlichen Bewertungsform:

Summe aus A1 bis A3: ≥ 4 = Zeichen einer akuten Osteomyelitis

Summe aus A1 bis A3 und C1 bis C2: ≥ 6 = Zeichen einer chronisch floriden (also aktiven) Osteomyelitis

Summe aus C1 bis C2: ≥ 4 = Zeichen einer chronischen Osteomyelitis

Summe aus C1 bis C2: ≤ 4 = Zeichen einer abgelaufenen (beruhigten) Osteomyelitis

Summe aus C1 bis C2: ≤ 1 = kein Anhalt für eine Osteomyelitis

Durch diese semiquantitative und numerische Bewertung der Kriterien für die akute und chronische Osteomyelitis ergibt sich der HOES in der schriftlichen Form (Abb.13).

<u>HOES: Schriftliche abgestufte Form</u>	
I	Zeichen einer akuten Osteomyelitis
II	Zeichen einer chronisch floriden (also aktiven) Osteomyelitis
III	Zeichen einer chronischen Osteomyelitis
IV	Zeichen einer abgelaufenen (beruhigten) Osteomyelitis

Abb. 13: Durch die semiquantitative und numerische Bewertung ergibt sich der HOES in der schriftlichen Form

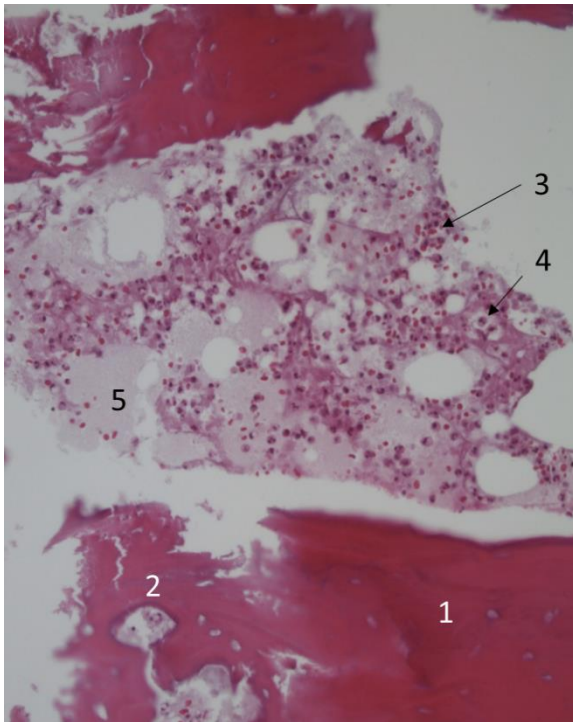


Abb.14: Kortikales (1) sowie spongiöses (2) Knochengewebe mit intramedullären Granulozytenansammlungen (3), Makrophagen (4) sowie Markraumödem (5) entsprechend einer bakteriellen Infektion.

HOES: Zeichen einer akuten Osteomyelitis

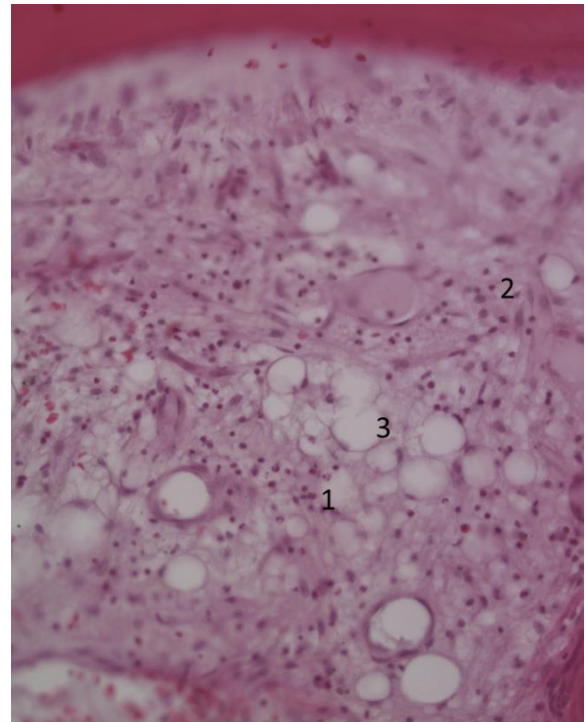


Abb.15: Knochengewebe mit intramedullären Granulozytenakkumulaten (1), Plasmazellakkumulaten (2) sowie von kleinherdigen Nekrosen (3).

HOES: Zeichen einer chronisch floriden, also aktiven Osteomyelitis

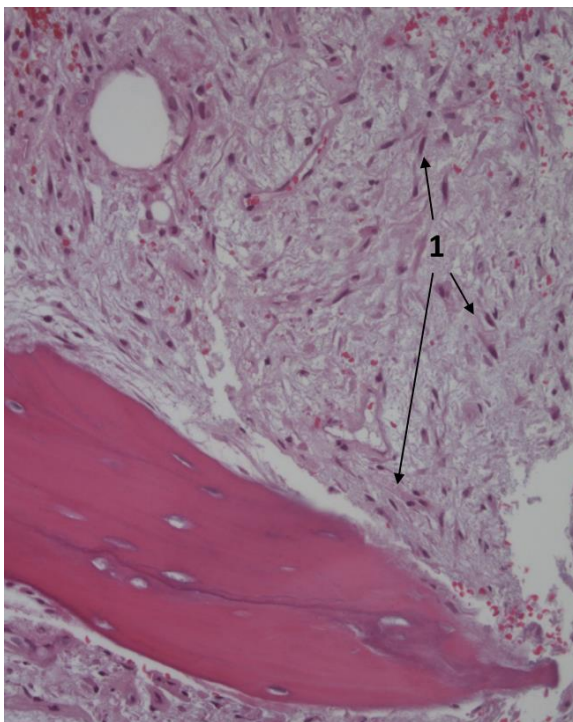


Abb.16: Geflechtknochengewebe mit ausgeprägter Fibrose (1), minimale intramedulläre Makrophagenakkumulate.

HOES: Zeichen einer chronischen Osteomyelitis

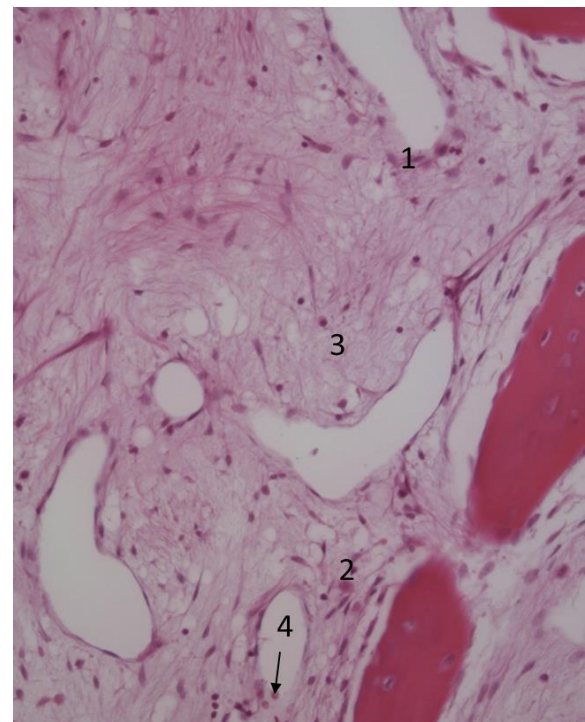


Abb.17: reaktive Knochenneubildung (1), Markraumfibrose (2), Markraumödem (3), minimaler Nachweis von Makrophagen (4).

HOES: Zeichen einer abgelaufenen, beruhigten Osteomyelitis

3.4. Falsch negative und falsch positive mikrobiologische Befunde

In der vorliegenden Arbeit wurde angenommen, daß in den histopathologischen Diagnoseklassen „Zeichen einer akuten Osteomyelitis“ und „Zeichen einer chronisch-floriden Osteomyelitis“ nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) ein positiver Erregernachweis zu erwarten wäre. Die Rate der negativen Erregernachweise in diesen Gruppen entspräche dann der falsch negativen Nachweisrate. Vorausgesetzt wurde die Entnahme von mindestens 3 Biopaten zur mikrobiologischen Diagnostik. Für mögliche falsch positive Erregernachweise wurde ein einfach positiver Erregernachweis aus mindestens 3 entnommenen Biopaten in den HOES-Gruppen „*Zeichen einer abgelaufenen (beruhigten) Osteomyelitis*“ und „*Kein Anhalt für eine Osteomyelitis*“ zugrunde gelegt.

3.5. Datensatz und Datenschutz

Die Daten wurden aus der elektronischen Patientenakte im BG-Klinikum Halle gewonnen, die nach den gesetzlichen datenschutzrechtlichen Vorschriften geführt wird. Zusätzliche Untersuchungen am Patienten zur Gewinnung von Studiendaten sind nicht erfolgt. Die Verwendung der Daten erfolgte anonymisiert. Die Patienten haben ihr schriftliches Einverständnis zur wissenschaftlichen Auswertung der Daten erklärt. Das Einverständnis des Datenschutzbeauftragten des BG-Klinikums Halle liegt vor. Die lokale Studie wurde dem Ethikrat der Friedrich-Schiller-Universität Jena angezeigt. Struktur des Datensatzes siehe Anhang.

3.6. Statistische Auswertung

Für die Studie wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit α von 5% ($\alpha=0,05$) festgelegt.

Bei der Auswertung der ordinalskalierten Daten erfolgten die Darstellung der Häufigkeiten in Kontingenztabellen und die Überprüfung der Abhängigkeit über die Berechnung der Spearman Rangkorrelation. Die Trendabschätzung in den Altersgruppen erfolgte über den Vergleich des Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten in diesen Gruppen.

Zur Überprüfung der Signifikanz der intervallskalierten Daten erfolgten die eindimensionale Varianzanalyse mit dem F-Test und die Zuordnung der Gruppen mit dem einfachen Scheffé-Test. Zusätzlich dazu wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt (Ludwig 1983).

4. Ergebnisse

4.1. Beschreibung der Daten

In der vorliegenden Studie wurden aus 491 Eingriffen Präparate von insgesamt 285 Patienten untersucht. Davon waren 209 Patienten männlich und 76 weiblich.

Alter

Zum Zeitpunkt der Operation war der jüngste Patient 16 Jahre, der älteste Patient 92 Jahre alt, das Durchschnittsalter betrug 57 Jahre.

Lokalisation

Eingriffe an den unteren Extremitäten oder am Becken machten 87% aller betrachteten Operationen aus, 13 % erfolgten am Thorax und den oberen Extremitäten.

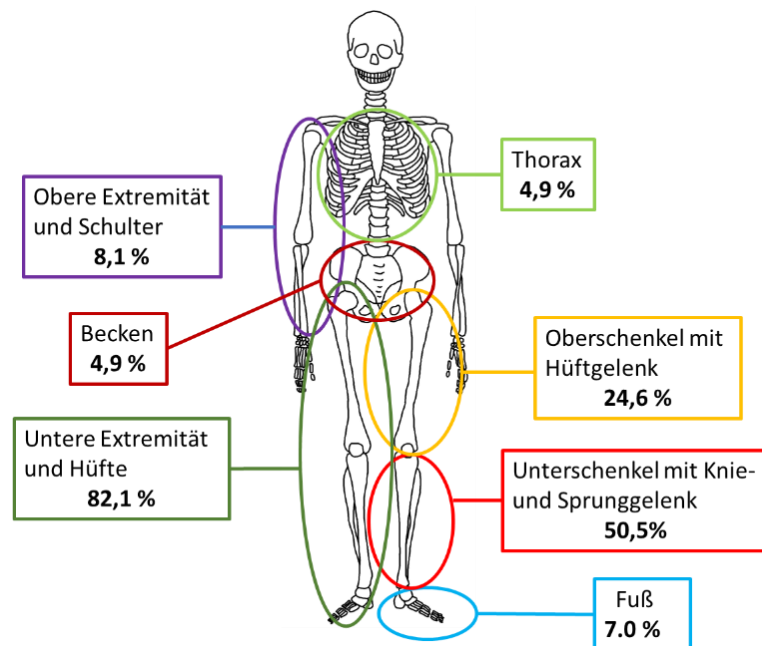


Abb.6: Eingriffslokalisierung prozentual

Klinische Diagnose und Implantat

Bei 36% der Patienten beschreibt die klinischen Diagnose eine akute oder akut exazerbierte, chronische Osteomyelitis, bei 63% eine chronische Osteomyelitis.

Eine implantatassoziierte Osteomyelitis bestand bei 176 Patienten, in dieser Patientengruppe wurden 329 Operationen durchgeführt. Bei 63 Patienten mit endoprothesenassoziiierter Osteomyelitis erfolgten 99 Operationen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Entität nach Implantat				
	nPatienten	%	nEingriffe	%
keine Osteomyelitis	2	0,70	2	0,4
Osteomyelitis	44	15,4	61	12,4
implantatassoziierte Osteomyelitis	176	61,8	329	67,0
endoprothesenassoziierte Osteomyelitis	63	22,1	99	20,2
gesamt	285	100	491	100

Tab.1: Entität nach Implantat

Histopathologischer Befund

In 491 Fällen erfolgte die Einordnung des histopathologischen Befundes nach dem HOES in schriftlich abgestufter Form (Abbildung 18):

- 71 Fälle (14%) „Zeichen einer akuten Osteomyelitis“
- 132 Fälle (27%) „Zeichen einer chronisch–floriden (also aktiven) Osteomyelitis“
- 161 Fälle (33%) „Zeichen einer chronischen Osteomyelitis“
- 88 Fälle (18%) „Zeichen einer abgelaufenen (beruhigten) Osteomyelitis“
- 39 Fälle (8%) „kein Anhalt für eine Osteomyelitis“

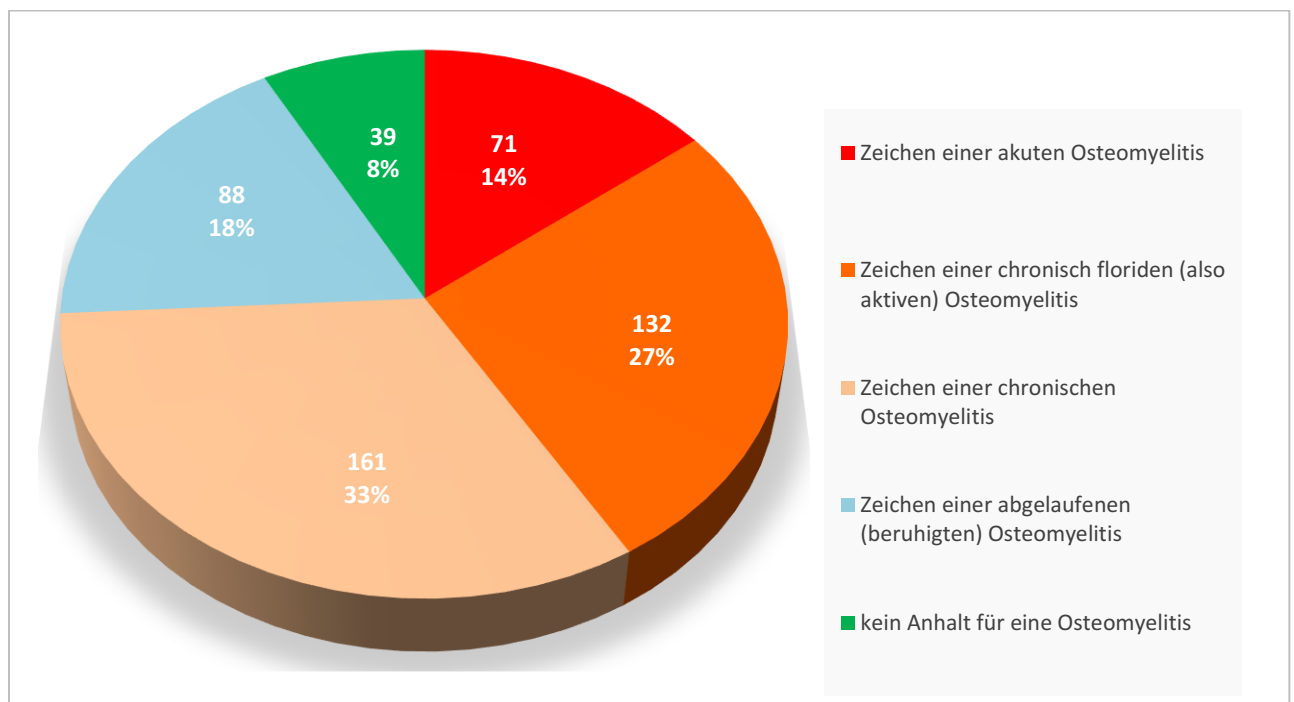


Abb. 18: Verteilung der Fälle in den Befundgruppen nach HOES

Mikrobiologischer Befund

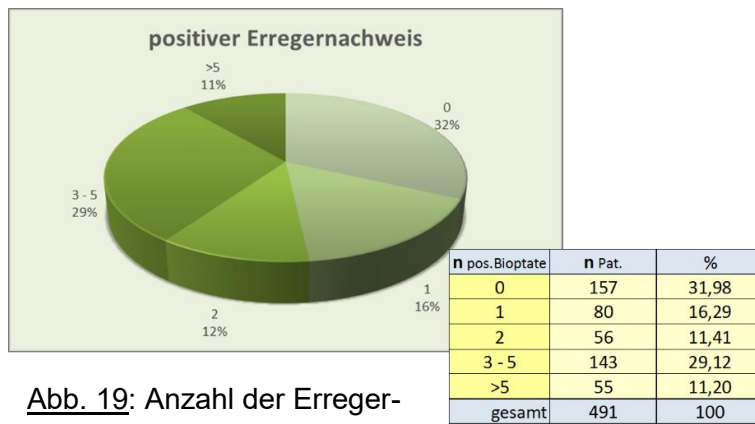


Abb. 19: Anzahl der Erregernachweise

Von 491 Operationen konnte in 334 Fällen (68%) ein Erregernachweis geführt werden. In 157 Fällen (32 %) gelang kein Erregernachweis, ein einfach positiver Erregernachweis erfolgte in 80 Fällen (16%). (Abbildung 19)

Staphylococcus aureus und Staphylococcus epidermidis wurden am häufigsten nachgewiesen, sie machten 46% aller Erreger aus. Eine Übersicht der Erreger zeigt Abb.20.

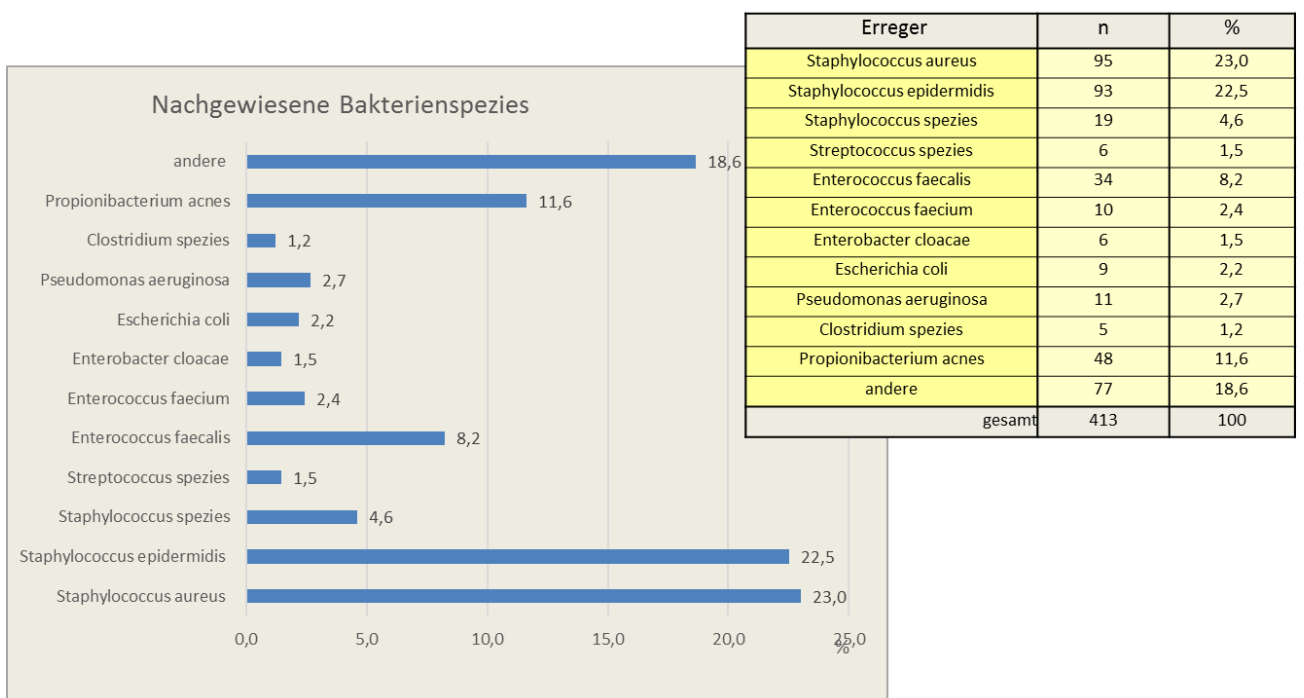


Abb 20: Erregerspektrum in 491 Eingriffen

4.2. Hypothesen

Hypothese 1: Die Zuordnung nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) stimmt mit der Zuordnung anhand des makroskopischen intraoperativen Befundes überein.

4.2.1.1. Gesamtfallkollektiv

Die Häufigkeit des Auftretens der Befundgruppen nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) und nach klinisch intraoperativer Beurteilung wurde für 491 Eingriffe in einer Kontingenztafel dargestellt

a) Übereinstimmung der Gruppengrößen und ihrer stadiengerechten Zuordnung:

- **akut:** Es wurden deutlich mehr Fälle in die klinische Gruppe „*akuter Infekt*“ (96 Fälle, entspr. 19,6%) als in die HOES-Gruppe „*Zeichen einer akuten Osteomyelitis*“ (71 Fälle, entspr. 14,5%) eingeordnet.
- **chronisch-floride, chronisch und infektberuhigt:** Ein direkter Vergleich der Gruppen ist nicht möglich. In der klinischen Einordnung existiert die Gruppe „*chronischer Infekt*“ nicht. Die korrespondierenden Fälle wurden klinisch den Gruppen „*chronisch-florider Infekt*“ oder „*infektberuhigt mit postentzündlichen Residuen*“ zugeordnet.
- **infektfrei:** Es wurden deutlich mehr Fälle in die klinische Gruppe „*makroskopisch infektfrei*“ (72 Fälle, entspr. 14,7%) als in die HOES-Gruppe „*Kein Anhalt für eine Osteomyelitis*“ (40 Fälle, 8,1%) eingeordnet (Abb.21).

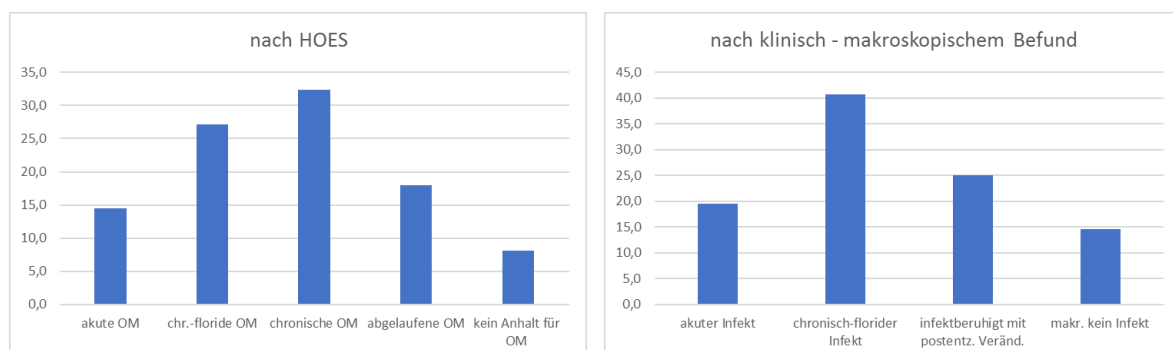


Abb.21: Übereinstimmung der Gruppengrößen und ihrer stadiengerechten Zuordnung

Kontingenztabelle

- 1. Zellenwert** gibt die Häufigkeit der Übereinstimmung des Zeilenbefundes mit dem Spaltenbefund an (nach Grad der Übereinstimmung farbig hinterlegt), der
- 2. Zellenwert** den Anteil der Fälle eines HOES-Stadiums (Zeile), die einer der klinischen Befundgruppen 1-4 (Spalte) zugewiesen wurden (entspricht dem **positiven Vorhersagewert der korrekten histopathologischen Einschätzung**), der
- 3. Zellenwert** zeigt den Anteil der Fälle einer klinischen Befundgruppe (Spalte), die histopathologisch einer der 5 HOES-Stadien (Zeile) zugewiesen wurden (entspricht dem **positiven Vorhersagewert der korrekten klinischen Einschätzung**). Der
- 4. Zellenwert** gibt den prozentualen Anteil der Gruppen-Übereinstimmung an der Gesamtzahl an.

Zelleninhalt	Makroskopischer intraoperativer Befund Knochen					
Wert						
Prozent Zeile						
Prozent Spalte						
Prozent absolut						
HOES-Stadium	akuter Infekt	chronisch - florider Infekt	infektberuhigt mit postentzündlichen Veränderungen	makroskopisch infektfrei		
Zeichen einer akuten Osteomyelitis	48 67,6 50,0 9,8	19 26,8 9,5 3,9	3 4,2 2,4 0,6	1 1,4 1,4 0,2	71 100,0 14,5	Summe Zeile Summe % Zeile Summe % absolut
Zeichen einer chronisch floriden (also aktiven) Osteomyelitis	26 19,5 27,1 5,3	84 63,2 42,0 17,1	11 8,3 8,9 2,2	12 9,0 16,7 2,4	133 100,0 27,1	
Zeichen einer chronischen Osteomyelitis	18 11,3 18,8 3,7	73 45,9 36,5 14,9	56 35,2 45,5 11,4	12 7,5 16,7 2,4	159 32,4	
Zeichen einer abgelaufenen (beruhigten) Osteomyelitis	3 3,4 3,1 0,6	18 20,5 9,0 3,7	43 48,9 35,0 8,8	24 27,3 33,3 4,9	88 17,9	
kein Anhalt für eine Osteomyelitis	1 2,5 1,0 0,2	6 15,0 3,0 1,2	10 25,0 8,1 2,0	23 57,5 31,9 4,7	40 8,1	
Summe Spalte	96	200	123	72	491	
Summe % Spalte	100,0	100,0	100,0	100,0		
Summe % absolut	19,6	40,7	25,1	14,7	100,0	

Übereinstimmung: >50 % 25 % - 50 % <25%

Spearman Correlation $r_s = 0,58139$; $P < 0,001$

Kontingenztabelle1: Häufigkeit des Auftretens der Befundgruppen nach HOES und nach klinisch intraoperativer Beurteilung für 491 Eingriffe.

b) Übereinstimmung der Zuordnungsgenauigkeit aller 491 Eingriffe:

Bei der Untersuchung aller 491 Fälle ist der Zusammenhang zwischen den histopathologischen und klinischen Befundgruppen signifikant (Rangkorrelation nach

Spearman $r_s = 0,58139$; $P < 0,001$). Die Treffergenauigkeit (accuracy) beträgt in den korrespondierenden Befundgruppen durchschnittlich 72,5%.

Für die HOES-Gruppe „**Zeichen einer akuten Osteomyelitis**“ und die klinischen Gruppe „**akuter Infekt**“:

- beträgt die errechnete Treffergenauigkeit 85,5%.
- Übereinstimmung des histopathologischen Befundes mit dem klinischen Befund besteht in 68% (positiver Vorhersagewert HOES), des klinischen mit dem histopathologischen Befund in 50% (positiver Vorhersagewert klinischer Befund).
- 27% der histopathologisch als akut eingeordneten Fälle werden klinisch als chronisch florider Infekt eingeschätzt.
- Bezieht man die klinische Gruppe „chronisch-florider Infekt“ mit ein, besteht eine kumulierte Übereinstimmung von 94% (histopathologisch) bzw. 60% (klinisch).

Für die HOES-Gruppe „**Zeichen einer chronisch-floriden (also aktiven) Osteomyelitis**“ und der klinischen Gruppe „**chronisch-florider Infekt**“:

- beträgt die errechnete Treffergenauigkeit 66,4%.
- Übereinstimmung des histopathologischen Befundes mit dem klinischen Befund (positiver Vorhersagewert HOES) besteht in 63%.
- Übereinstimmung der klinischen mit der histopathologischen Beurteilung (positiver Vorhersagewert klinischer Befund) besteht in 42%.
- 20% der histopathologisch als chronisch-floride eingeordneten Fälle werden klinisch als akuter Infekt eingeschätzt.
- Bezieht man die klinische Gruppe „akuter Infekt“ mit ein, besteht eine kumulierte Übereinstimmung von 83% bzw. 69% für die histopathologische Beurteilung.

Eine der Gruppe „**Zeichen einer chronischen Osteomyelitis**“ entsprechende klinische Gruppe fehlt.

- Mit der klinischen Gruppe „**chronisch-florider Infekt**“
 - beträgt die errechnete Treffergenauigkeit 56,6%.
 - Es besteht eine Übereinstimmung des histopathologischen Befundes mit dem klinischen Befund in 46%, der klinischen mit der histopathologischen Beurteilung in 36,5%.

- Mit der klinischen Gruppe „**infektberuhigt mit postentzündlichen Residuen**“
 - o beträgt die errechnete Treffergenauigkeit (accuracy) 65,4%.
 - o Übereinstimmung des histopathologischen Befundes mit dem klinischen Befund in 35%, der klinischen mit der histopathologischen Beurteilung 45,5%.
- Bezieht man beide klinische Gruppen „**chronisch-florider Infekt**“ und „**infektberuhigt mit postentzündlichen Residuen**“ mit ein, besteht eine kumulierte Übereinstimmung von 81% bzw 82%.

In der HOES-Gruppe „**Zeichen einer abgelaufenen (beruhigten) Osteomyelitis**“ und der klinischen Gruppe „**infektberuhigt mit postentzündlichen Residuen**“:

- beträgt die errechnete Treffergenauigkeit 74,5%.
- Es besteht eine Übereinstimmung des histopathologischen Befundes mit dem klinischen Befund in 49%.
- Die Übereinstimmung der klinischen mit der histopathologischen Beurteilung ist mit 35% niedriger.
- 27% der histopathologisch als infektberuhigt eingeordneten Fälle werden klinisch als makroskopisch infektfrei eingeschätzt.
- Bezieht man die klinische Gruppe „makroskopisch infektfrei“ mit ein, besteht eine kumulierte Übereinstimmung von 76% bzw. 68%.

In der HOES-Gruppe „**Kein Anhalt für eine Osteomyelitis**“ und der klinischen Gruppe „**makroskopisch infektfrei**“:

- beträgt die errechnete Treffergenauigkeit (accuracy) 74,5%.
- Es besteht eine Übereinstimmung des histopathologischen Befundes mit dem klinischen Befund in 58%.
- Die Übereinstimmung der klinischen mit der histopathologischen Beurteilung ist mit 32% niedriger.
- 25% der histopathologisch als ohne Anhalt für eine Osteomyelitis eingeordneten Fälle werden klinisch als makroskopisch infektberuhigt mit postentzündlichen Residuen eingeschätzt.
- Bezieht man die klinische Gruppe „**infektberuhigt mit postentzündlichen Residuen**“ ein, besteht eine kumulierte Übereinstimmung von 83% bzw. 40%.

Bezieht man die jeweils benachbarte Befundgruppe in die Betrachtung ein, stellt sich eine deutlich höhere kumulierte Übereinstimmung von i.d.R. über 75% dar (Kontingenztafel 2, grün hinterlegte Felder).

- Am höchsten ist die Übereinstimmung in der HOES-Gruppe „**Zeichen einer akuten Osteomyelitis**“ und den klinischen Gruppen „**akuter Infekt**“ und „**chronisch-florider Infekt**“ mit 94%.
- Am niedrigsten ist sie in der klinischen Gruppe „**makroskopisch infektfrei**“ und den HOES-Gruppen „**Kein Anhalt für eine Osteomyelitis**“ und „**Zeichen einer abgelaufenen (beruhigten) Osteomyelitis**“ mit 65%.

HOES-Stadium	Makroskopischer intraoperativer Befund Knochen				Makroskopischer intraoperativer Befund Knochen			
	akuter Infekt	chronisch - florider Infekt	infektberuhigt mit postentzündlichen Veränderungen	makroskopisch infektfrei	akuter Infekt	chronisch - florider Infekt	infektberuhigt mit postentzündlichen Veränderungen	makroskopisch infektfrei
Zeichen einer akuten Osteomyelitis	67 94,4	3 4,2	1 1,4	1 1,4	74	19 26,8	3 4,2	1 1,4
Zeichen einer chronisch floriden (also aktiven) Osteomyelitis	110 82,7	11 8,3	12 9,0	12 16,7	77,1	157	11 8,3	12 9,0
Zeichen einer chronischen Osteomyelitis	18 11,3 18,8	129 81,1	12 7,5	12 16,7	18 11,3 18,8	78,5	99	12 7,5 16,7
Zeichen einer abgelaufenen (beruhigten) Osteomyelitis	3 3,4 3,1	18 20,5 9,0	67 76,1		3 3,4 3,1	18 20,5 9,0	80,5	47
kein Anhalt für eine Osteomyelitis	1 2,5 1,0	6 15,0 3,0	33 82,5		1 2,5 1,0	6 15,0 3,0	10 25,0 8,1	65,3

Kontingenztafel 2: li.: histopathologische vs. klinische Übereinstimmung

re.: klinische vs. histopathologische Übereinstimmung

Für die beiden Klassifikatoren histopathologische Beurteilung nach dem HOES und klinisch-makroskopische Befundbeurteilung wurden die in Tabelle 2 abgebildeten statistischen Kenngrößen ermittelt.

- Die Treffergenauigkeit (accuracy) beträgt in den korrespondierenden Befundgruppen durchschnittlich 72,5%.
- Für die histopathologische Beurteilung wurde ein positiver Vorhersagewert von 53 % ermittelt, die Sensitivität beträgt 40%, die Spezifität 84%. Für die kumulierte Betrachtung beträgt der positive Vorhersagewert 83% und die Sensitivität 73%.
- Für die klinische Beurteilung wurden ein positiver Vorhersagewert von 40%, eine Sensitivität von 53% und eine Spezifität von 77% ermittelt. Für die kumulierte Betrachtung beträgt der positive Vorhersagewert 73%.

- Der Zusammenhang zwischen den histopathologischen und klinischen Befundgruppen ist signifikant (Rangkorrelation nach Spearman $r_s = 0,58139$; $P < 0,001$).

Tabelle 2 : Statistische Kriterien	für die klinisch makroskopische Beurteilung	für die histopathologische Beurteilung
Positiver Vorhersagewert	40,1	53
Negativer Vorhersagewert	84	76,6
Sensitivität	53	40,1
falsch negative Rate	47	59,9
falsch positive Rate	23,4	16
Spezifität	76,6	84

Tab.2: Die Statistischen Gütekriterien belegen eine höhere Genauigkeit der histopathologischen Einschätzung

4.2.1.2. Zuordnung nach implantat- oder endoprothesenassoziertem Auftreten

Es besteht kein signifikanter Unterschied zur Verteilung in der Gesamtgruppe aller 491 Eingriffe. Unterschiede bestehen in den Gruppengrößen insbesondere für das akute Stadium. Die statistischen Kriterien hierfür sind in Tabelle 4 aufgeführt.

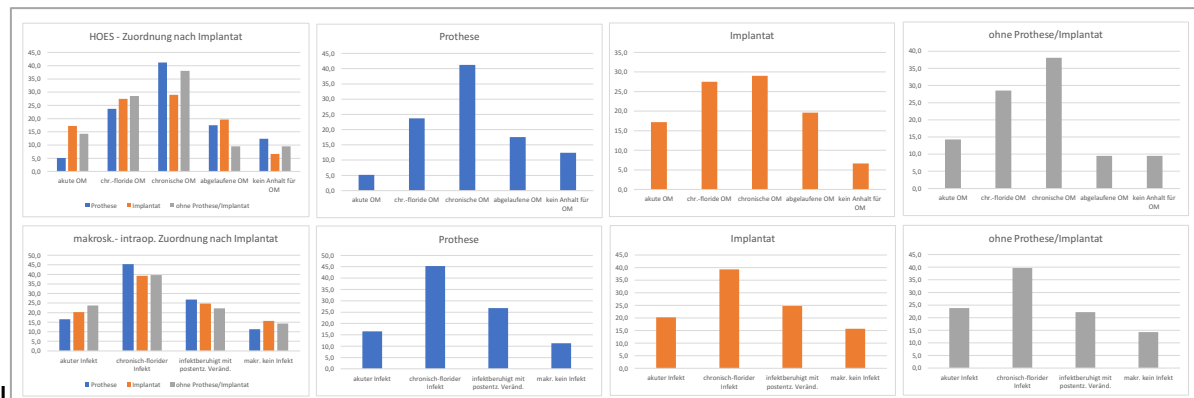


Abb. 22: Zuordnungshäufigkeit HOES nach Implantat

4.2.1.3. Zuordnung nach Altersgruppen

Es wurde die Verteilung der Häufigkeiten in den Altersgruppen 18 bis 40 Jahre, 41 bis 65 Jahre und über 65 Jahre untersucht:

Beobachtung 1:

Die Spearman-Korrelation r_s nimmt in den Altersgruppen tendenziell ab (18 bis 45 Jahre: $r_s = 0,75481$; 41 bis 65 Jahre: $r_s = 0,59427$; über 65 Jahre: $r_s = 0,48528$). Die Befundzuordnung ist in der Altersgruppe 18 bis 40 Jahre am genauesten, d.h. näher an der "Idealverteilung" der einander entsprechenden Befunde. Der positive prädiktive Wert liegt hier für die histopathologische Beurteilung bei 60% und für die klinische Beurteilung bei 45%. Die Varianz nimmt in den Altersgruppen zu. In der Gruppe >65 Jahre sind alle Felder, auch die mit den am weitesten divergierenden Befundkonstellationen, besetzt.

Dieser Trend lässt sich auch bei der implantatbezogenen Untersuchung zeigen, für die prothesenassoziierte Osteomyelitis besteht aufgrund der kleinen Fallgruppe keine Signifikanz.

Beobachtung 2:

In der Altersgruppe 40 bis 65 Jahre nimmt die Häufigkeiten der Zuordnung (Spalte 1) in die klinische Gruppe „akuter Infekt“ prozentual ab, in der klinischen Gruppe „chronisch-florider Infekt“ (Spalte 2) steigt sie in den Altersgruppen.

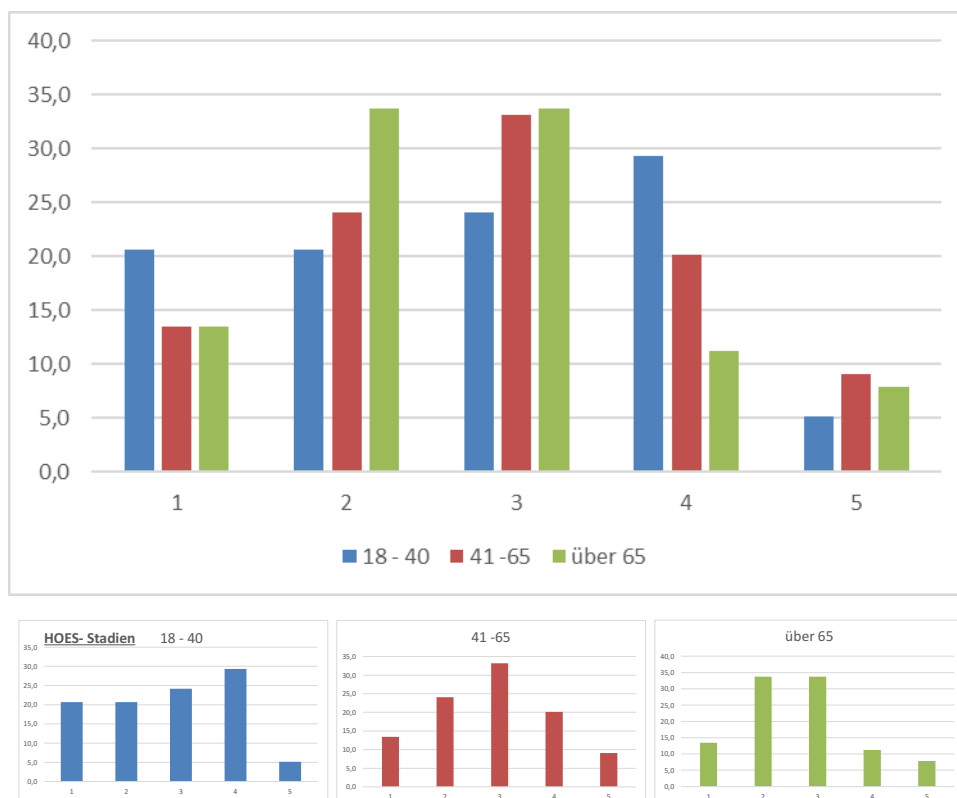


Abb. 23: Zuordnungshäufigkeit HOES nach Altersgruppen

Altersgruppe 18-40 Jahre		Makroskopischer intraoperativer Befund Knochen				
Spearman Correlation $r_s = 0,755$; P<0,001		akuter Infekt	chronisch - florider Infekt	infektberuhigt mit postentzündlichen Veränderungen	makroskopisch infektfrei	
HOES-Stadium						
Zeichen einer akuten Osteomyelitis	11	1	0	0	12	Summe
	91,7	8,3	0,0	0,0	20,7	%
	68,8	7,1	0,0	0,0		
	19,0	1,7	0,0	0,0	20,7	
Zeichen einer chronisch floriden (also aktiven) Osteomyelitis	3	7	1	1	12	Summe
	25,0	58,3	8,3	8,3	20,7	%
	18,8	50,0	5,9	9,1		
	5,2	12,1	1,7	1,7	20,7	
Zeichen einer chronischen Osteomyelitis	1	4	8	1	14	Summe
	7,1	28,6	57,1	7,1	24,1	%
	6,3	28,6	47,1	9,1		
	1,7	6,9	13,8	1,7	24,1	
Zeichen einer abgelaufenen (beruhigten) Osteomyelitis	1	2	8	6	17	Summe
	5,9	11,8	47,1	35,3	29,3	%
	6,3	14,3	47,1	54,5		
	1,7	3,4	13,8	10,3	29,3	
kein Anhalt für eine Osteomyelitis	0	0	0	3	3	Summe
	0,0	0,0	0,0	100,0	5,2	%
	0,0	0,0	0,0	27,3		
	0,0	0,0	0,0	5,2	5,2	
	16	14	17	11	58	Summe
	100,0	100,0	100,0	100,0		%
	27,6	24,1	29,3	19,0	100,0	

Altersgruppe 41-65 Jahre		Makroskopischer intraoperativer Befund Knochen				
Spearman Correlation r_s =0,594; P<0,001		akuter Infekt	chronisch - florider Infekt	infektberuhigt mit postentzündlichen Veränderungen	makroskopisch infektfrei	
HOES-Stadium						
Zeichen einer akuten Osteomyelitis	19	13	2	0	34	Summe
	55,9	38,2	5,9	0,0	13,4	%
	47,5	13,4	2,6	0,0		
	7,5	5,1	0,8	0,0	13,4	
Zeichen einer chronisch floriden (also aktiven) Osteomyelitis	10	38	8	5	61	Summe
	16,4	62,3	13,1	8,2	24,1	%
	25,0	39,2	10,4	12,8		
	4,0	15,0	3,2	2,0	24,1	
Zeichen einer chronischen Osteomyelitis	10	32	33	9	84	Summe
	11,9	38,1	39,3	10,7	33,2	%
	25,0	33,0	42,9	23,1		
	4,0	12,6	13,0	3,6	33,2	
Zeichen einer abgelaufenen (beruhigten) Osteomyelitis	1	9	28	13	51	Summe
	2,0	17,6	54,9	25,5	20,2	%
	2,5	9,3	36,4	33,3		
	0,4	3,6	11,1	5,1	20,2	
kein Anhalt für eine Osteomyelitis	0	5	6	12	23	Summe
	0,0	21,7	26,1	52,2	9,1	%
	0,0	5,2	7,8	30,8		
	0,0	2,0	2,4	4,7	9,1	
	40	97	77	39	253	Summe
	100,0	100,0	100,0	100,0		%
	15,8	38,3	30,4	15,4	100,0	

Altersgruppe über 65 Jahre		Makroskopischer intraoperativer Befund Knochen					
Spearman Correlation r_s =0,485; P<0,001		akuter Infekt	chronisch - florider Infekt	infektberuhigt mit postentzündlichen Veränderungen	makroskopisch infektfrei		
HOES-Stadium							
Zeichen einer akuten Osteomyelitis	17	5	1	1	24	Summe	
	70,8	20,8	4,2	4,2	100,0	%	
	44,7	5,6	3,4	4,5			
	9,6	2,8	0,6	0,6	13,5		
Zeichen einer chronisch floriden (also aktiven) Osteomyelitis	13	39	2	6	60	Summe	
	21,7	65,0	3,3	10,0	100,0	%	
	34,2	43,8	6,9	27,3			
	7,3	21,9	1,1	3,4	33,7		
Zeichen einer chronischen Osteomyelitis	6	37	15	2	60	Summe	
	10,0	61,7	25,0	3,3	100,0	%	
	15,8	41,6	51,7	9,1			
	3,4	20,8	8,4	1,1	33,7		
Zeichen einer abgelaufenen (beruhigten) Osteomyelitis	1	7	7	5	20	Summe	
	5,0	35,0	35,0	25,0	100,0	%	
	2,6	7,9	24,1	22,7			
	0,6	3,9	3,9	2,8	11,2		
kein Anhalt für eine Osteomyelitis	1	1	4	8	14	Summe	
	7,1	7,1	28,6	57,1	100,0	%	
	2,6	1,1	13,8	36,4			
	0,6	0,6	2,2	4,5	7,9	Summe	
	38	89	29	22	178		%
	100,0	100,0	100,0	100,0			
	21,3	50,0	16,3	12,4	100,0		

Kontingenztab. 3-5: Altersgruppenbezogenes Auftreten der Befundgruppen

Mit einer Faktorenanalyse erfolgte für die Variablen „HOES-Stadium“ und „makroskopischer intraoperativer Befund“ eine Dimensionreduktion auf eine Variable, welche 79% der Varianz der beiden ursprünglichen Variablen aufklärt.

Mit der ANOVA konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen festgestellt werden ($P=0,108$).

Tabelle 3: Stat. Kriterien in den Altersgruppen	18-40 J.	41-65 J.	über 65 J.	alle Altersgruppen.
Spearman K r_s	0,755	0,594	0,485	0,581
pos. Vorhers.-wert HOES (%)	64	50,4	52,5	53
pos. Vorhers.-wert klinisch (%)	45	38,8	40	40

Tab.3: Der Vergleich der 3 Alterskategorien zeigt eine abnehmende Stärke des Zusammenhanges (Spearman K) und eine mit dem Alter abnehmende Genauigkeit der Testverfahren (keine Signifikanz)

Tabelle 4: Korrelation in den Altersgruppen	Spearman K 18-40 J.	Spearman K 41-65 J.	Spearman K über 65 J.	Spearman K alle Altersgruppen
Ohne Implantat/Prothese	0,972	0,6042	0,919	0,622
Implantatassoziiert OM	0,809	0,616	0,471	0,602
Prothesenassoziierte OM	(nicht signif.)	0,427 (nicht signif.)	0,397	0,458 ($P < 0,001$)

Tab.4: Der Vergleich der 3 Alterskategorien zeigt auch implantatassoziiert eine abnehmende Stärke des Zusammenhanges (Spearman K) (keine Signifikanz)

Zusammenfassung Hypothese 1:

- Die Zuordnung nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) stimmt mit der anhand des makroskopischen intraoperativen Befundes gewonnenen Einschätzung mit einer Treffergenauigkeit von 72,5% überein.

Hypothese 2: Die intraoperativ gewonnenen mikrobiologischen Befunde stimmen mit der erwarteten Zuordnung nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) überein.

In 334 Eingriffen wurden Erreger nachgewiesen, berücksichtigt man Mehrfachnachweise, wurden 413 positive Erregernachweise geführt.

Für die statistische Betrachtung intervallskalierter Daten ist die kategorische Behandlung der Gruppe „Kein Anhalt für eine Osteomyelitis“ gemeinsam mit den anderen Gruppen nicht zulässig, sie wird im Vergleich mit den anderen Befundgruppen der Kategorie „Osteomyelitis ja“ als eigenständige Kategorie „Osteomyelitis nein“ behandelt, aber im Interesse einer vollständigen Darstellung mit aufgeführt.

4.2.2.1. Übereinstimmung der intraoperativ gewonnenen mikrobiologischen Befunde mit der erwarteten Zuordnung nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES):

- In der HOES-Gruppe „*Zeichen einer akuten Osteomyelitis*“ wird ein positiver Erregernachweis erwartet, er findet sich in 83% der Fälle.
- In der HOES-Gruppe „*Zeichen einer chronisch-floriden (also aktiven) Osteomyelitis*“ wird ein positiver Erregernachweis erwartet, er findet sich in 73% der Fälle.
- Betrachtet man die HOES-Gruppen „*Zeichen einer akuten Osteomyelitis*“ und „*Zeichen einer chronisch-floriden (also aktiven) Osteomyelitis*“ gemeinsam, umfasst die Gruppe 203 Fälle. Hier findet sich in 76 % der erwartete Erregernachweis, kein Erreger findet sich in 24% der Fälle. Diese Größenordnung deckt sich mit den in der Literatur angegebenen Zahlen für falsch negative Erregernachweise und wird in der Diskussion weiter besprochen.
- In der HOES-Gruppe „*Zeichen einer chronischen Osteomyelitis*“ wird ein positiver Erregernachweis mit geringerer Wahrscheinlichkeit erwartet, er findet sich in 66% der Fälle.
- In der HOES-Gruppe „*Zeichen einer abgelaufenen (beruhigten) Osteomyelitis*“ wird ein negativer Erregernachweis erwartet, er findet sich in 47% der Fälle. In 53 Prozent erfolgt ein Erregernachweis.

- In der HOES-Gruppe „*Kein Anhalt für eine Osteomyelitis*“ wird ein negativer Erregernachweis erwartet, er findet sich in 33,5% der Fälle. In 67,5 % erfolgt ein Erregernachweis.

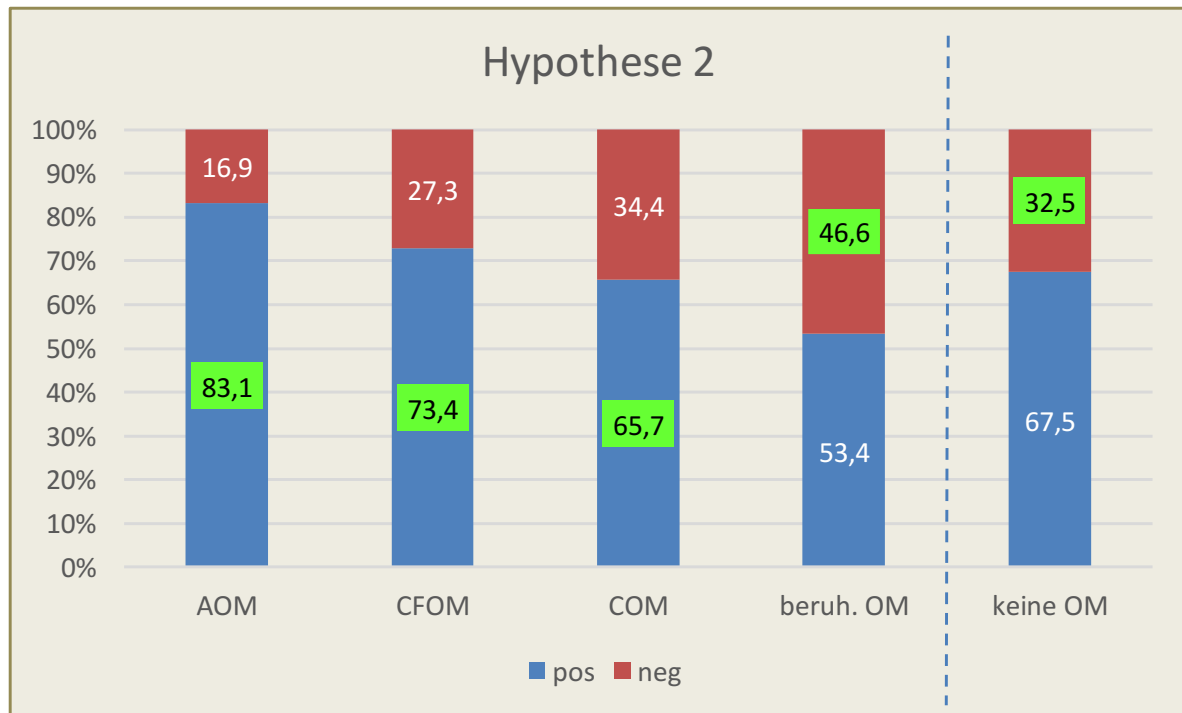


Abb.24: positive und negative Erregernachweise in den HOES-Gruppen (grün hinterlegt Erwartung 100%)

4.2.2.2. Zusammenhang zwischen der Anzahl der Erregernachweise und dem Infektstadium.

Die Anzahl der Erregernachweise pro Befundgruppe zeigt Tabelle 5.

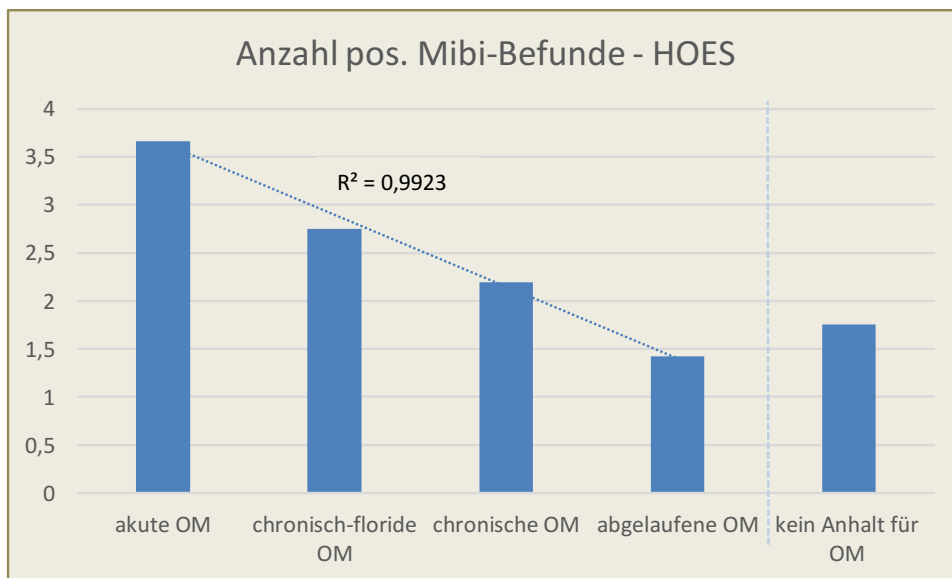
	AOM		CFOM		COM		abg.OM		keine OM		Gesamt	
Keimnachweis	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	12	16,9	36	27,3	55	34,4	41	46,6	13	32,5	157	32,0
1	9	12,70	18	13,60	22	13,80	19	21,60	12	30,00	80	16,29
2 bis 5	33	46,48	61	46,21	69	43,13	25	28,41	12	30,00	200	40,73
> 5	17	23,94	18	13,64	14	8,75	3	3,41	3	7,50	55	11,20
gesamt	71	100,00	132	100,00	160	100,00	88	100,00	40	100,00	491	100,20
Mittelwert	3,68		2,73		2,17		1,43		1,76			

Tab.5: Erregernachweise in den HOES-Gruppen

Die statistische Prüfung erfolgte mit dem F-Test und einer eindimensionalen Varianzanalyse (einfacher Scheffé-Test). Unabhängigkeit der Daten wurde zwischen

den Gruppen 1 und 3, 4, 5 sowie Gruppe 2 und 4 im Signifikanzniveau $P < 0,05$ ermittelt.

Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der durchschnittlichen Zahl der Erregernachweise und der Akuität der histopathologischen Befundgruppe nach HOES (Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,99$). (Abbildung 25)



n Mibi-Bef.	HOES - Stadium				
	akute OM	chronisch-floride OM	chronische OM	abgelaufene OM	kein Anhalt für OM
Anzahl	71	132	160	88	40
Mittelwert	3,66	2,75	2,19	1,42	1,75
Minimum	0	0	0	0	0
Maximum	20	11	8	7	8
Standardabweichung	3,26	2,55	2,24	1,89	2,1
Standardfehler	0,39	0,22	0,18	0,2	0,33
Die statistische Prüfung erfolgte mit dem F-Test und einer eindimensionalen Varianzanalyse (einfacher Scheffé-Test). Unabhängigkeit der Daten wurde zwischen der Gruppe 1 und 3, 4, 5 und zwischen der Gruppe 2 und 4 im Signifikanzniveau $P < 0,05$ ermittelt.					

Abb.25: Mittelwertverteilung positiver mikrobiologischer Proben in den HOES-Gruppen ($R^2 = 0,99$ in Gruppen 1-4, bei Einbeziehung der Gruppe "kein Anhalt für OM" $R^2 = 0,85$)

4.2.2.3. Die vorliegenden Daten wurden auf den Anteil möglicher falsch negativer und falsch positiver Erregernachweise geprüft. Voraussetzung ist eine Mindestzahl von 3 entnommenen Biopaten.

Falsch negativer Erregernachweis (≥3 entnommene Biopiate, negativer Erregernachweis):

- HOES-Gruppe „Zeichen einer akuten Osteomyelitis“ 15,5 %
- HOES-Gruppe „Zeichen einer chronisch-floriden Osteomyelitis“ 24,2%
- Beide HOES-Gruppen gemeinsam 21,2%

In den beiden Gruppen „Zeichen einer abgelaufenen (beruhigten) Osteomyelitis“ und „Kein Anhalt für eine Osteomyelitis“ (128 Fälle) fand sich in 74 Fällen (58%) ein Erregernachweis. Davon weisen 31 Fälle einfach positive Befunde auf. Diese verteilen sich je zu einem Drittel auf Staphylococcus epidermidis, Propionibacterium acnes und andere Bakterien.

Falsch positiver Erregernachweis (≥3 entnommene Biopiate, einfach positiver Erregernachweis):

- HOES-Gruppe „Zeichen einer abgelaufenen (beruhigten) Osteomyelitis“ 18,2%
- HOES-Gruppe „Kein Anhalt für eine Osteomyelitis“ 20%
- Beide HOES-Gruppen gemeinsam 18,8 %

Tab.6: falsch negativer Erregernachweis in den HOES -Gruppen mit hoher Akuität

falsch negativer Err.- Nachweis	AOM		CFOM		Gesamt	
	n	%	n	%	n	%
0	12	16,9	36	27,3	48	23,6
<3 Proben	1	1,41	3	2,27	4	1,97
3 bis 5 Proben	6	8,45	22	16,67	28	13,79
> 5 Proben	5	7,04	10	7,58	15	7,39
falsch negativ		15,49		24,24		21,18

falsch positiver Err.-Nachweis	abg.OM		keine OM		Gesamt	
	n	%	n	%	n	%
einfach pos.	19	21,6	12	30,0	31	24,2
<3 Proben	3	3,41	4	10,00	7	5,47
3 bis 5 Proben	12	13,64	4	10,00	16	12,50
> 5 Proben	4	4,55	4	10,00	8	6,25
falsch positiv		18,18		20,00		18,75

Tab.7: falsch positiver Erregernachweis in den HOES -Gruppen mit geringer Akuität

Zusammenfassung Hypothese 2:

- Die intraoperativ gewonnenen mikrobiologischen Befunde stimmen mit der erwarteten Zuordnung nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) für die akute und floride Osteomyelitis zu 76%, für die Osteomyelitis ohne Infektanhalt zu 47% überein.
- Die Anzahl der positiven mikrobiologischen Proben nimmt linear mit der Akuität in den Befundgruppen zu.

- *Die Rate der falsch negativen und falsch positiven mikrobiologischen Befunde liegt bei etwa 20%.*

Hypothese 3: Die intraoperativ gewonnenen mikrobiologischen Befunde stimmen mit der erwarteten Zuordnung zu den makroskopischen intraoperativen Befunden überein.

Für die statistische Betrachtung intervallskalierter Daten ist die kategorische Behandlung der Gruppe „makroskopisch kein Infekt“ gemeinsam mit den anderen Gruppen nicht zulässig, sie wird als eigenständige Kategorie behandelt, aber im Interesse einer vollständigen Darstellung mit aufgeführt.

4.2.3.1. Die Untersuchung der Übereinstimmung der intraoperativ gewonnenen mikrobiologischen Befunde mit der erwarteten Zuordnung zu den makroskopischen intraoperativen Befunden zeigte folgende Ergebnisse:

- In der klinischen Gruppe „*akuter Infekt*“ wird ein positiver Erregernachweis erwartet, er findet sich in 83% der Fälle.
- In der klinischen Gruppe „*chronisch-florider Infekt*“ wird ein positiver Erregernachweis erwartet, er findet sich in 76% der Fälle.
- Betrachtet man die klinischen Gruppen „*akuter Infekt*“ und „*chronisch-florider Infekt*“ gemeinsam, umfasst die Gruppe 297 Fälle. Hier findet sich in 79 % der erwartete Erregernachweis, kein Erreger findet sich in 21% der Fälle. Diese Größenordnung deckt sich mit den in der Literatur angegebenen Zahlen für falsch negative Erregernachweise und wird in der Diskussion weiter besprochen.
- In der klinischen Gruppe „*infektberuhigt mit postentzündlichen Residuen*“ wird ein negativer Erregernachweis erwartet, er findet sich in 49% der Fälle. In 51 Prozent erfolgt ein Erregernachweis.
- In der klinischen Gruppe „*makroskopisch infektfrei*“ wird ein negativer Erregernachweis erwartet, er findet sich in 46% der Fälle. In 54 Prozent erfolgt ein Erregernachweis.

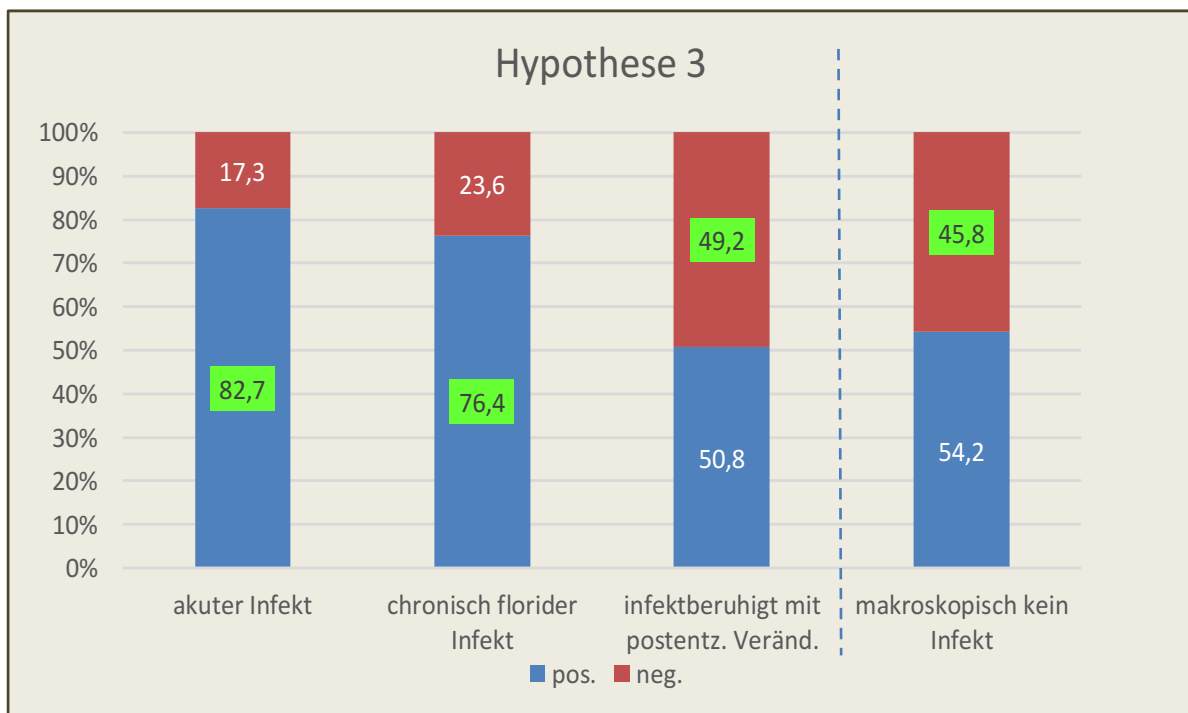


Abb.26: positive und negative Erregernachweise in den den klinisch-makroskopischen Befundgruppen; (grün hinterlegt Erwartung 100%)

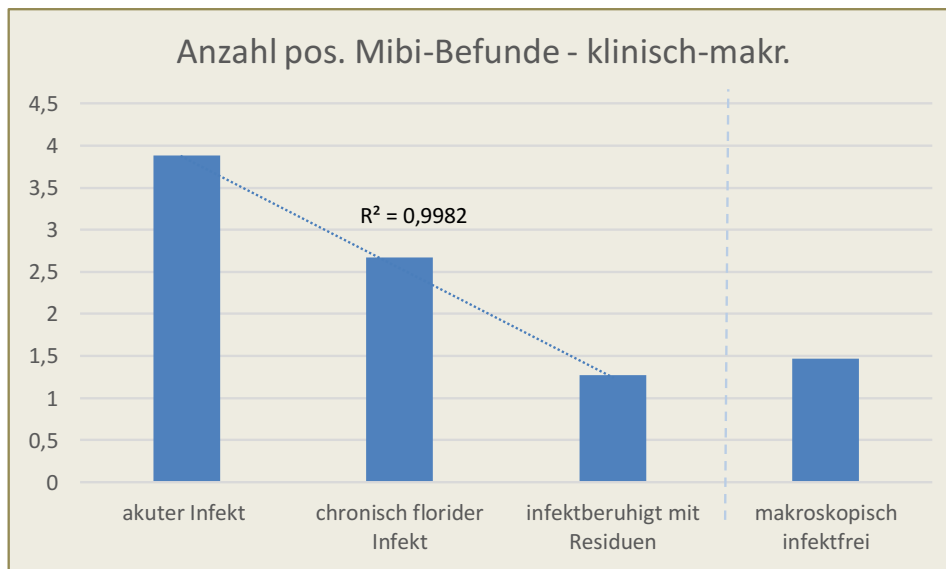
4.2.3.2. Untersucht wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der Anzahl der Erregernachweise und dem Infektstadium. Die Anzahl der Erregernachweise pro Befundgruppe zeigt Tabelle 8.

	akuter Infekt		chronisch-florider Infekt		infektberuhigt mit postentz. Veränd.		makroskopisch kein Infektanhalt		Gesamt	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	17	17,3	47	23,6	60	49,2	33	45,8	157	32,0
1	10	10,2	32	16,1	23	18,9	14	19,4	79	16,1
2 bis 5	44	44,9	99	49,7	37	30,3	20	27,8	200	40,7
>5	27	27,6	21	10,6	2	1,6	5	6,9	55	11,2
gesamt	98	100,0	199	100,0	122	100,0	72	100,0	491	100,0

Tab.8: Erregernachweise in den klinisch-makroskopischen Gruppen

Die statistische Prüfung erfolgte mit dem F-Test und einer eindimensionalen Varianzanalyse (einfacher Scheffé-Test). Nur Gruppe 3 und 4 unterscheiden sich nicht signifikant ($P < 0,05$).

Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der durchschnittlichen Zahl der Erregernachweise und der Akuität der klinisch-makroskopischen Befundgruppe (Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,99$). Siehe Abbildung 27.



n Mibi-Bef.	klinisch-makroskopischer Befund			
	akuter Infekt	chronisch florider Infekt	infektberuhigt mit Residuen	makroskopisch infektfrei
Anzahl	97	199	122	72
Mittelwert	3,88	2,67	1,27	1,47
Minimum	0	0	0	0
Maximum	20	9	6	8
Standardabweichung	3,27	2,28	1,65	2,01
Standardfehler	0,33	0,16	0,15	0,24
Die statistische Prüfung erfolgte mit dem F-Test und einer eindimensionalen Varianzanalyse (einfacher Scheffé-Test). Unabhängigkeit der Daten wurde zwischen den Gruppen 1 und 2, 3, 4, sowie Gruppe 2 und 3, 4 im Signifikanzniveau $P < 0,05$ ermittelt.				

Abb. 27: Die Mittelwerte der Anzahl positiver mikrobiologischer Proben in den klinischen Gruppen (Gruppe 1= akuter Infekt, Gruppe 2= chronisch -florider Infekt, Gruppe 3= infektberuhigt mit Residuen) sind linear verteilt ($R^2 = 0,99$ in Gruppen 1-3, bei Einbeziehung der Gruppe 4= "makr.infektfrei" $R^2 = 0,85$)

4.2.3.3. Die vorliegenden Daten wurden auf den Anteil möglicher falsch negativer und falsch positiver Erregernachweise untersucht. Voraussetzung ist eine Mindestzahl von 3 entnommenen Biopaten.

Falsch negativer Erregernachweis:

(≥ 3 entnommene Biopate, negativer Erregernachweis)

- klinischen Gruppe „*akuter Infekt*“ 17,3%
- klinischen Gruppe „*chronisch-florider Infekt*“ 19,6%
- Beide klinische Gruppen gemeinsam 18,9 %

In den beiden klinischen Gruppen „*infektberuhigt mit postentzündlichen Residuen*“ und „*makroskopisch infektfrei*“ (194 Fälle) fanden sich 101 Erregernachweise (52%), davon 37 einfach positive Befunde. Diese verteilen sich zu etwa einem Drittel auf *S. epidermidis*, *P. acnes* und andere Bakterien.

falsch positiver Erregernachweis:

(≥3 entnommene Biopate, einfach positiver Erregernachweis)

- klinische Gruppe „*infektberuhigt mit postentzündlichen Residuen*“ 16,4%
- klinische Gruppe „*makroskopisch infektfrei*“ 13,9%
- Beide klinische Gruppen gemeinsam 15,5 %

Tab.9: falsch negativer Erregernachweis in den klinischen Gruppen mit hoher Akuität

falsch negativer Err.- Nachweis	akuter Infekt		chronisch florider Infekt		Gesamt	
	n	%	n	%	n	%
0	17	17,3	47	23,6	64	21,5
<3 Proben	0	0,00	8	4,02	8	2,69
3 bis 5 Proben	9	9,18	16	8,04	25	8,42
> 5 Proben	8	8,16	23	11,56	31	10,44
falsch negativ		17,35		19,60		18,86

falsch positiver Err.-Nachweis	infektberuhigt mit Residuen		makroskopisch infektfrei		Gesamt	
	n	%	n	%	n	%
einfach pos.	23	18,9	14	19,4	37	19,1
<3 Proben	3	2,46	4	5,56	7	3,61
3 bis 5 Proben	15	12,30	6	8,33	21	10,82
> 5 Proben	5	4,10	4	5,56	9	4,64
falsch positiv		16,39		13,89		15,46

Tab.10: falsch positiver Erregernachweis in den klinischen Gruppen mit geringer Akuität

Zusammenfassung Hypothese 3:

- Die intraoperativ gewonnenen mikrobiologischen Befunde stimmen mit der erwarteten Zuordnung zu den makroskopischen intraoperativen Befunden für die akute und floride Osteomyelitis zu 79%, für die Osteomyelitis ohne Infektanhalt zu 46% überein.
- Die Anzahl der positiven mikrobiologischen Proben nimmt linear mit der Akuität in den Befundgruppen zu.
- Die Rate der falsch negativen mikrobiologischen Befunde liegt bei etwa 20%, der falsch positiven Befunde bei etwa 15%.

Hypothese 4: Mikrobiologischer Befund und klinische Einordnung anhand des makroskopischen intraoperativen Befundes weisen gemeinsam eine höhere Übereinstimmung mit der histopathologischen Einteilung nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) auf.

Es wurde untersucht, ob der positive Vorhersagewert und der statistische Zusammenhang der Befundgruppen zunehmen, wenn die klinisch-makroskopischen intraoperativen Befunde zusätzlich den für diese Befundgruppe erwarteten mikrobiologischen Erregernachweis aufweisen.

In den klinischen Gruppen „akuter Infekt“ und „chronisch-florider Infekt“ wird ein positiver, in den Gruppen „infektberuhigt mit postentzündlichen Residuen“ und „makroskopisch infektfrei“ wird kein Erregernachweis erwartet.

Zelleninhalt Wert Prozent Zeile Prozent Spalte Prozent absolut HOES-Stadium	Makroskopischer intraoperativer Befund Knochen plus erwarteter mikrobiologischer Befund					
	akuter Infekt + pos. Mibi	chronisch - florider Infekt + pos. Mibi	infektberuhigt mit postentzündlichen Veränderungen + neg. Mibi	makroskopisch infektfrei + neg. Mibi		
Zeichen einer akuten Osteomyelitis	41 70,7 50,0 12,2	16 27,6 10,1 4,8	1 0,0 1,6 0,3	0 0,0 0,0 0,0	58 98,3 0,0 17,3	Summe Zeile Summe % Zeile Summe % absolut
Zeichen einer chronisch floriden (also aktiven) Osteomyelitis	22 21,2 26,8 6,6	68 65,4 43,0 20,3	7 6,7 11,5 2,1	7 6,7 20,6 2,1	104 100,0 31,0	
Zeichen einer chronischen Osteomyelitis	15 14,0 18,3 4,5	58 54,2 36,7 17,3	28 26,2 45,9 8,4	6 5,6 17,6 1,8	107 31,9	
Zeichen einer abgelaufenen (beruhigten) Osteomyelitis	3 5,9 3,7 0,9	13 25,5 8,2 3,9	22 43,1 36,1 6,6	13 25,5 38,2 3,9	51 15,2	
kein Anhalt für eine Osteomyelitis	1 6,7 1,2 0,3	3 20,0 1,9 0,9	3 20,0 4,9 0,9	8 53,3 23,5 2,4	15 4,5	
Summe Spalte	82	158	61	34	335	
Summe % Spalte	100,0	100,0	100,0	100,0		
Summe % absolut	24,5	47,2	18,2	10,1	100,0	

Spearman Correlation $r_s = 0,5566$; $P < 0,001$

Kontingenztab.6: Selektierte Darstellung der Fälle mit erwartungsgemäßem Erregernachweis (oben)

Abb.28: Die Selektion der Fälle mit erwartetem mikrobiologischem Befund führt zu keiner Änderung der statistischen Gütekriterien.

	klinisch-makroskopische Beurteilung+ erwart. Mibi-Bef.	klinisch-makroskopische Beurteilung
Treffergenauigkeit	73	73
pos. Vorhersagewert	39	40
Sensitivität	52	53
Spezifität	78	78
Spearman-Koeff.	0,557	0,581

Für die Variable „klinisch-makroskopischer Befund und erwarteter mikrobiologischer Befund gemeinsam“ wurden ein unveränderter positiver Vorhersagewert (39 %, vorher 40%), Sensitivität (52%; 53%) und Spezifität (78%, 78%) ermittelt.

Zusammenfassung Hypothese 4:

- *Mikrobiologischer Befund und die klinische Einordnung anhand des makroskopischen intraoperativen Befundes weisen gemeinsam keine höhere Übereinstimmung mit der histopathologischen Einteilung nach dem HOES auf.*

Hypothese 5: Aus der Verteilung der nachgewiesenen Erreger in den histopathologischen Diagnoseklassen nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) lässt sich auf ihre Pathogenität schließen.

Am häufigsten kamen *Staphylococcus aureus* (23%; n=95) und *Staphylococcus epidermidis* (23%; n=93) vor, gefolgt von *Propionibacterium acnes* (12%, n=48) und *Enterococcus faecalis* (8%; n=34). Die prozentuale Verteilung der Bakterienspezies in den HOES-Gruppen ist in Tab. 11 dargestellt.

- Die Häufigkeit der Nachweise von *Staphylococcus aureus* nimmt mit geringer werdender Akuität in den Befundgruppen nach HOES linear ab (Bestimmtheitsmaß $R^2=0,964$). Insgesamt 65% der Nachweise wurden dem akuten (35%) und chronisch- floriden (30%) Stadium zugeordnet.
- Die Häufigkeit der Nachweise von *Staphylococcus epidermidis* verhält sich entgegengesetzt und nimmt mit geringer werdender Akuität in den Befundgruppen nach HOES linear zu ($R^2=0,884$). Im infektberuhigten Stadium macht *Staphylococcus epidermidis* ein Viertel (25%), im infektfreien Stadium sogar fast die Hälfte (42%) aller nachgewiesenen Erreger aus.
Für *Staphylococcus epidermidis* waren 25 von 93 Nachweisen einfach positiv, 29mal trat er gleichzeitig mit anderen Erregern auf. Ein falsch positiver Nachweis ist in 16 % wahrscheinlich (15 einfach pos. Nachweise von ≥ 3 Biopäten, s. Tabelle 9.).

- *Propionibacterium acnes* wurde in 48 Fällen (12 %) nachgewiesen.
41 Nachweise erfolgten bei Männern, 7 bei Frauen (Verhältnis 6:1). Er repräsentiert 32% aller positiven Erregernachweise bei histopathologisch bestehenden Zeichen einer abgelaufenen (beruhigten) Osteomyelitis und 17% bei histopathologisch fehlendem Anhalt für eine Osteomyelitis. Hier ist er zu 46% und 24% seines Vorkommens verteilt. Die Häufigkeit nimmt mit sinkender Akuität annähernd proportional zu ($R^2=0,81$) 17 von 48 Nachweisen waren einfach positiv, 20mal trat er gleichzeitig mit anderen Erregern auf (*S. aureus* 5, *S. epidermidis* 7, *Staphylococcus* spezies 8, *Enterococcus faecalis* 2). Ein falsch positiver Nachweis ist in 33 % wahrscheinlich (16 einfach pos. Nachweise von ≥ 3 Bioptaten, s. Tab. 10).
- *Enterococcus faecalis* wurde in 34 Fällen (8 %) nachgewiesen, davon 21 Mischinfektionen (*S. aureus* 3, *S. epidermidis* 7, *Finnegoldia magna* 7, *Pseudomonas aeruginosa* 2, *Propionibacterium acnes* 2). Er ist zu 38% seines Vorkommens auf das chronisch-floride und zu 33% auf das chronische Entzündungsstadium nach HOES verteilt. Für den Erreger *Enterococcus faecalis* besteht keine lineare Verteilung.

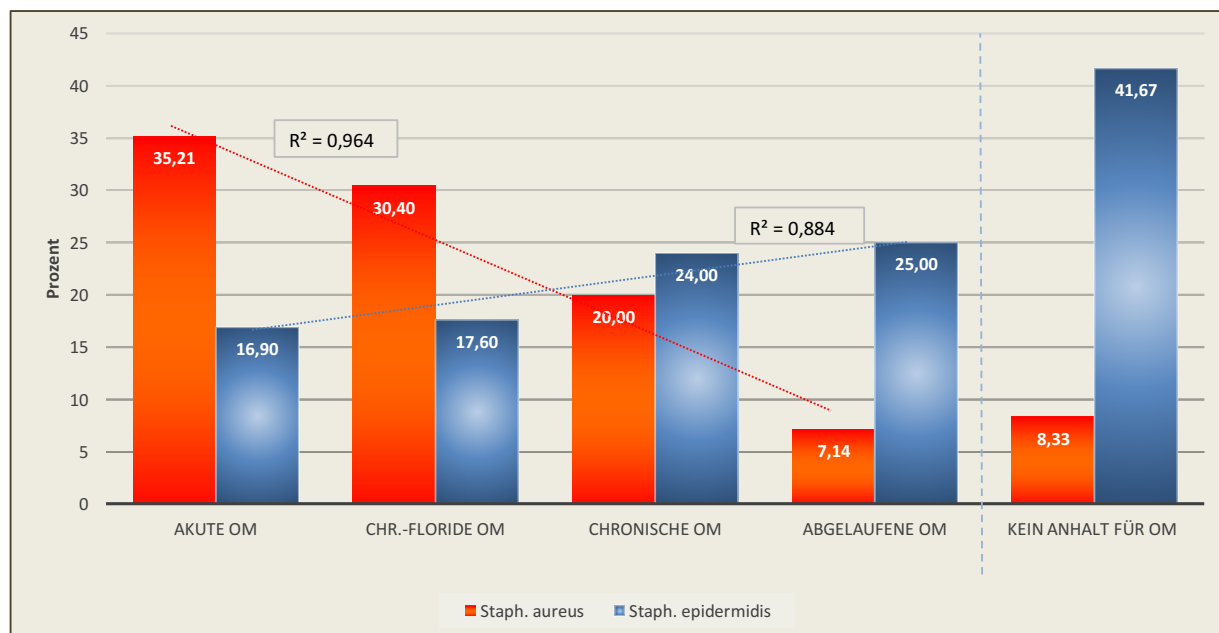


Abb.29: Die Häufigkeit des Auftretens von *Staphylococcus aureus* (S.a.) und *Staphylococcus epidermidis* (S.e.) in den HOES-Gruppen ist linear verteilt (R^2 =Bestimmtheitsmaß, S.a. $R^2=0,964$; S.e. $R^2=0,884$; bei Einschluß der HOES-Gruppe „Kein Anhalt für Osteomyelitis“ S.a. $R^2=0,926$; S.e. $R^2=0,812$)

Es stellt sich ein charakteristisches Verteilungsmuster für *S. aureus* (hochpathogen), *E. faecalis* (mittlere Pathogenität) und *S. epidermidis* sowie *P. acnes* (niedrigpathogen) dar.

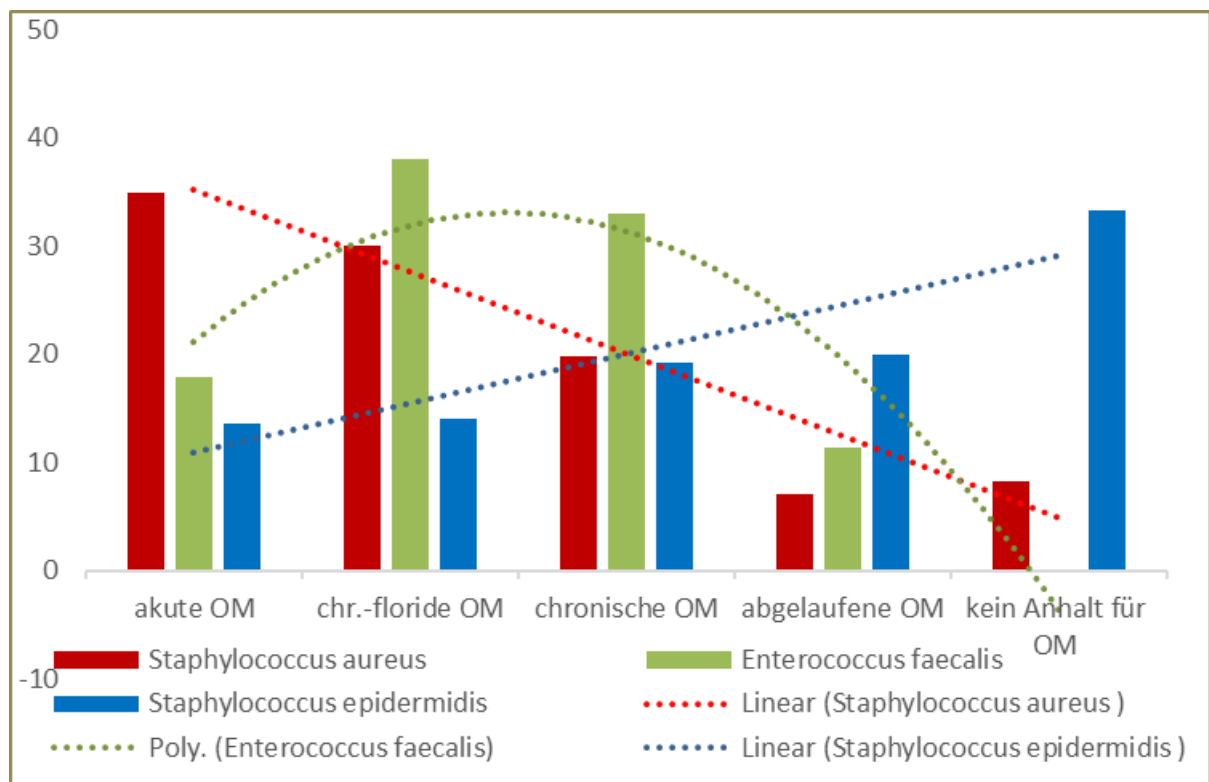


Abb.30: Die Verteilung der Erreger ist charakteristisch für den jeweiligen Pathogenitätsgrad.

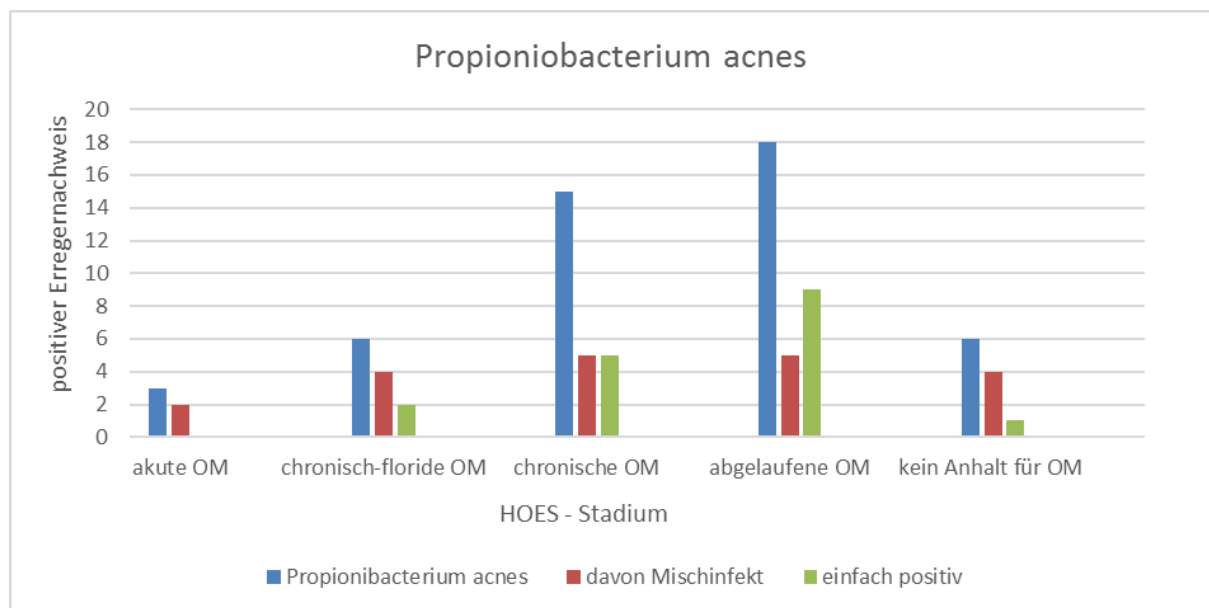


Abb.31: *Propionibacterium acnes* (P.a.) wird häufig einfach positiv nachgewiesen (grüner Balken).

	akute OM		chr.-floride OM		chronische OM		abgelaufene OM		Kein Anhalt für OM		Gesamt	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Staph. aureus	25	35,21	38	30,40	25	20,00	4	7,14	3	8,33	95	23,00
Staph. epiderm.	12	16,90	22	17,60	30	24,00	14	25,00	15	41,67	93	22,52
Staph.spezies	1	1,41	3	2,40	6	4,80	7	12,50	2	5,56	19	4,60
Strept.spezies	1	1,41	5	4,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	6	1,45
E. faecalis	4	5,63	15	12,00	13	10,40	2	3,57	0	0,00	34	8,23
E. faecium	4	5,63	2	1,60	2	1,60	1	1,79	1	2,78	10	2,42
E. cloacae	2	2,82	1	0,80	2	1,60	1	1,79	0	0,00	6	1,45
E. coli	2	2,82	3	2,40	4	3,20	0	0,00	0	0,00	9	2,18
P. aeruginosa	2	2,82	2	1,60	5	4,00	1	1,79	1	2,78	11	2,66
Cl. spezie	2	2,82	0	0,00	2	1,60	0	0,00	1	2,78	5	1,21
Prop. acnes	3	4,23	6	4,80	15	12,00	18	32,14	6	16,67	48	11,62
andere	13	18,31	28	22,40	21	16,80	8	14,29	7	19,44	77	18,64
gesamt	71	100	125	100	125	100	56	100	36	100	413	100

Tab.11: Erregerverteilung in den HOES-Gruppen

Zusammenfassung Hypothese 5:

- Die Verteilung der nachgewiesenen Erreger in den Diagnoseklassen nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) weist der jeweiligen Pathogenität klar zuzuordnende Verteilungscharakteristika auf.
- Aus der Verteilung der nachgewiesenen Erreger in den histopathologischen Diagnoseklassen nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) lässt sich auf ihre Pathogenität schließen.

Hypothese 6: Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Zuordnung nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) und der Höhe der Entzündungsparameter CRP und Leukozytenzahl

a) Untersucht wurde für 491 Fälle der Zusammenhang zwischen der Höhe der Entzündungsparameter C-reaktives Protein (CRP) und Leukozytenzahl und der histopathologischen Eingruppierung nach dem HOES und dessen Signifikanz.

CRP

Für die Mittelwerte des Entzündungswertes CRP besteht ein linearer Verlauf im Verhältnis mit der Eingruppierung nach dem HOES ($R^2=0.995$) (siehe Tab. 32).

In einer Varianzanalyse wurde die Unabhängigkeit der Variablen untersucht. Außer den HOES-Gruppen „Zeichen einer akuten Osteomyelitis“ und „Zeichen einer chronisch-floriden (also aktiven) Osteomyelitis“ zueinander waren allen Gruppen unabhängig ($P<0,05$).

Leukozytenzahl

Für die Mittelwerte des Entzündungswertes Leukozytenzahl besteht ein linearer Verlauf im Verhältnis mit der Eingruppierung nach dem HOES ($R^2= 0,933$) (siehe Tab. 33).

Die HOES-Gruppen „Zeichen einer akuten Osteomyelitis“ und „Zeichen einer chronisch-floriden (also aktiven) Osteomyelitis“ waren zur Gruppe „Zeichen einer abgelaufenen Osteomyelitis“ unabhängig ($P<0,05$).

b) Der Zusammenhang wurde auch für die klinisch-makroskopischen Befundgruppen untersucht.

CRP

Für die Mittelwerte des Entzündungswertes CRP besteht ein linearer Verlauf im Verhältnis zur Eingruppierung nach dem klinischen Befund ($R^2=0.951$) (siehe Tab. 34).

In einer Varianzanalyse wurde die Unabhängigkeit der Variablen untersucht. Unabhängigkeit bestand zwischen den Gruppen 1 mit 2, 3, 4 sowie 2 mit 3, 4, ($P<0,05$).

Leukozytenzahl

Für die Mittelwerte des Entzündungswertes Leukozytenzahl besteht ein linearer Verlauf im Verhältnis zur Eingruppierung nach dem klinischen Befund ($R^2= 0,960$) (siehe Tab.35).

In einer Varianzanalyse wurde die Unabhängigkeit der Variablen untersucht. Unabhängigkeit bestand zwischen den Gruppen 1 mit 3,4. ($P<0,05$).

CRP	HOES - Stadium				
	akute OM	chronisch-floride OM	chronische OM	abgelaufene OM	kein Anhalt für OM
Anzahl	71	132	160	88	40
Mittelwert	74,63	58,42	34,03	15,33	23,3
Minimum	1	1	1	1	3
Maximum	408	420	300	119	330
Standardabweichung	88,64	74,21	52,06	20,68	53,05
Standardfehler	10,52	6,46	4,12	2,2	8,39

Die statistische Prüfung erfolgte mit dem F-Test und einer eindimensionalen Varianzanalyse (einfacher Scheffé-Test). Unabhängigkeit der Daten wurde zwischen den Gruppen 1 von 3, 4, 5 und zwischen den Gruppen 2 von 3, 4, 5 im Signifikanzniveau $P < 0,05$ ermittelt.

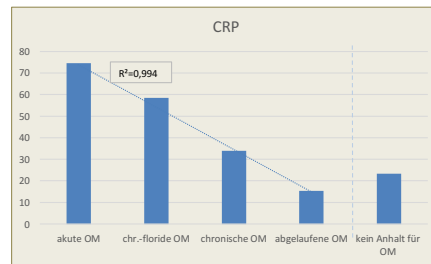


Abb.32: Die CRP-Mittelwerte in den HOES-Gruppen (Gruppe 1= akute OM, Gruppe 2= chronisch - floride OM, Gruppe 3= chronische OM, Gruppe 4=abgelaufene OM) sind linear verteilt ($R^2 = 0,994$)

Leukozyten	HOES - Stadium				
	akute OM	chronisch-floride OM	chronische OM	abgelaufene OM	kein Anhalt für OM
Anzahl	71	132	160	88	40
Mittelwert	8,38	8,08	7,57	6,57	8,04
Minimum	2	3	3	4	4
Maximum	18	30	26	11	37
Standardabweichung	3,3	3,44	2,92	1,68	5,46
Standardfehler	0,39	0,3	0,23	0,18	0,86

Die statistische Prüfung erfolgte mit dem F-Test und einer eindimensionalen Varianzanalyse (einfacher Scheffé-Test). Unabhängigkeit der Daten wurde zwischen der Gruppe 1 und 4 und zwischen der Gruppe 2 und 4 im Signifikanzniveau $P < 0,05$ ermittelt.

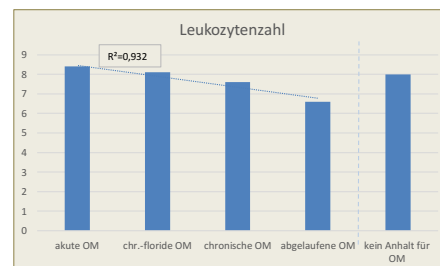


Abb.33: Die Mittelwerte der Leukozytenzahl in den HOES-Gruppen (Gruppe 1= akute OM, Gruppe 2= chronisch - floride OM, Gruppe 3= chronische OM, Gruppe 4=abgelaufene OM) sind linear verteilt ($R^2 = 0,932$)

CRP	Klinisch - makroskopischer Befund			
	akuter Infekt	chronisch-florider Infekt	infektberuhigt mit postentz. Veränd.	makroskopisch kein Infektanhalt
Anzahl	98	199	122	72
Mittelwert	103,91	40,14	12,40	14,60
Minimum	1	1	1	1
Maximum	420	330	94	122
Standardabweichung	98,65	50,44	15,74	21,35
Standardfehler	9,95	3,58	1,42	2,52

Die statistische Prüfung erfolgte mit dem F-Test und einer eindimensionalen Varianzanalyse (einfacher Scheffé-Test). Unabhängigkeit der Daten zwischen den Gruppen 1 von 2, 3, 4 und zwischen den Gruppen 2 von 3, 4 im Signifikanzniveau $P < 0,05$ ermittelt.

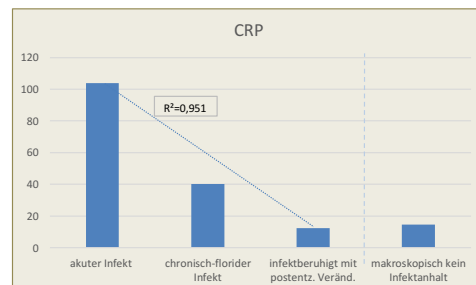


Abb.34: Die CRP-Mittelwerte in den klinischen Gruppen (Gruppe 1= akuter Infekt, Gruppe 2= chronisch - florider Infekt, Gruppe 3= infektberuhigt mit Residuen) sind linear verteilt ($R^2 = 0,951$).

Leukozyten	Klinisch - makroskopischer Befund			
	akuter Infekt	chronisch-florider Infekt	infektberuhigt mit postentz. Veränd.	makroskopisch kein Infektanhalt
Anzahl	98	199	122	72
Mittelwert	8,69	7,75	7,30	6,78
Minimum	2,4	2,9	3	3,6
Maximum	23,7	36,6	26,1	16,1
Standardabweichung	3,49	3,50	3,12	2,00
Standardfehler	0,35	0,25	0,28	0,23

Die statistische Prüfung erfolgte mit dem F-Test und einer eindimensionalen Varianzanalyse (einfacher Scheffé-Test). Unabhängigkeit der Daten zwischen den Gruppen 1 von 3, 4 im Signifikanzniveau $P < 0,05$ ermittelt.

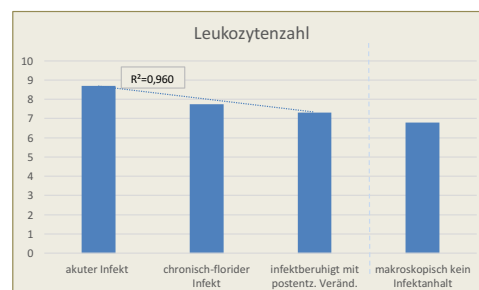


Abb.35: Die Mittelwerte der Leukozytenzahl in den klinischen Gruppen (Gruppe 1= akuter Infekt, Gruppe 2= chronisch - florider Infekt, Gruppe 3= infektberuhigt mit Residuen) sind linear verteilt ($R^2 = 0,960$).

Zusammenfassung Hypothese 6 :

- *Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Zuordnung nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) und der Höhe der Entzündungsparameter CRP und Leukozytenzahl.*

Hypothese 7: Anhand des Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) läßt sich der Zeitpunkt der Chronifizierung einer akuten Osteomyelitis bestimmen.

Anhand der histopathologischen Einteilung in die HOES-Gruppe „Zeichen einer akuten Osteomyelitis“ einerseits und „Zeichen einer chronisch-floriden (also aktiven) Osteomyelitis“ sowie „Zeichen einer chronischen Osteomyelitis“ andererseits wurde das Auftreten akuter bzw. chronischer Befunde in den ersten 12 Infektwochen (Zeit nach möglicher Keiminokulation) für 98 Fälle untersucht (Infektdauer siehe Abb. 36). Der Gruppe „Zeichen einer akuten Osteomyelitis“ zugeordnete Fälle traten von der 1. Woche bis zur 6. Woche regelhaft (22 Fälle), ab der 7. Woche sporadisch (5 Fälle) und nach der 10. Woche nicht mehr auf (rote Balken).

Die Zuordnung zu den Gruppen „Zeichen einer chronisch-floriden (also aktiven) Osteomyelitis“ sowie „Zeichen einer chronischen Osteomyelitis“ erfolgte von der 1. Woche bis zur 6. Woche in 34 Fällen, nach der 7. Woche in 33 Fällen (blaue Balken).

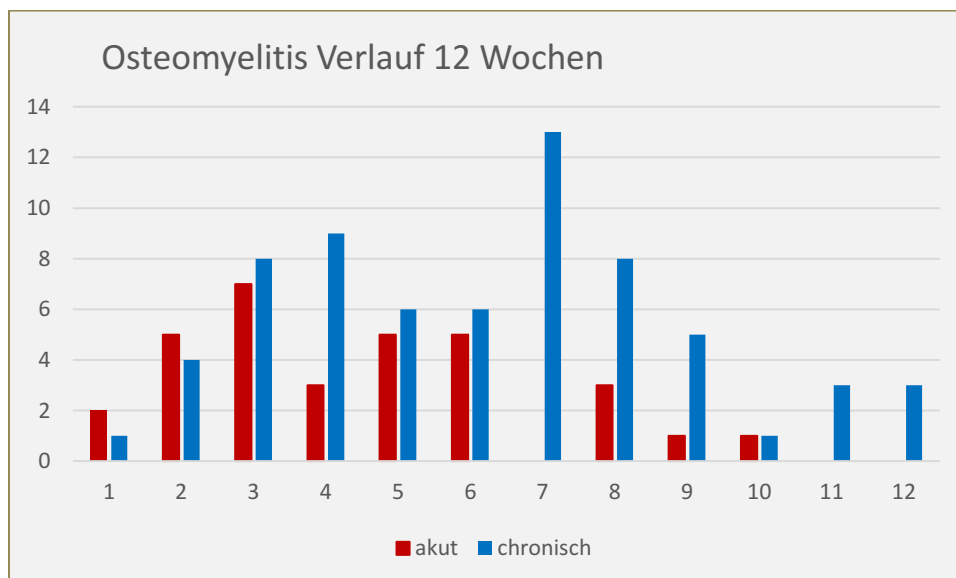


Abb.36: zeitliches Auftreten akute und chronische Osteomyelitis

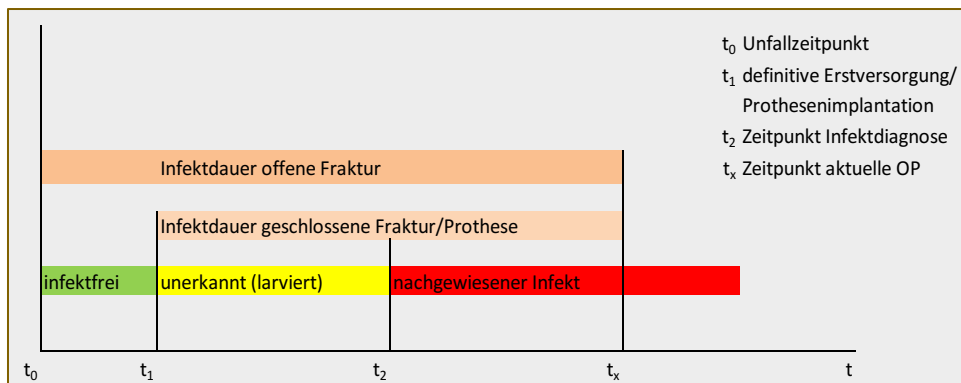


Abb.37: Bestimmung der Infektdauer für offene und geschlossene Frakturen und Prothesen

Zusammenfassung Hypothese 7:

- *Anhand des Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) lässt sich mit den vorhandenen Daten der Zeitpunkt der Chronifizierung einer akuten Osteomyelitis lediglich abschätzen. Zeichen einer chronischen Osteomyelitis können bereits nach einer Woche auftreten.*

5. Diskussion

Die Entscheidungsprozesse des Histopathologen, die Kriterien, die unter Umständen zur therapieentscheidenden histopathologischen Diagnose führen, liegen für den Behandler oft im Verborgenen. Aus dem Kondensat dieser Prozesse, dem histopathologischen Befund, stehen sie ihm nicht mehr für die eigene Bewertung zur Verfügung. Daran ändert auch die Befundbeschreibung wenig.

Mit der Etablierung des Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscores (HOES) steht ein histopathologisches Instrument zur Verfügung, mit welchem die Akuität der Osteomyelitis standardisiert in einem Scoring System abgebildet ist und somit erstmalig eine Auswertbarkeit der verschiedenen Osteomyelitisstadien im Vergleich mit entsprechenden klinischen, paraklinischen und mikrobiologischen Befunden möglich wird. Somit lässt sich histopathologisch eine Objektivierung des Befundes, der Diagnose Osteomyelitis, der Akuität und des Therapieerfolges erreichen.

Jedes Stadium der Entzündungsreaktion wird durch charakteristische Zellpopulationen und Veränderungen am Erfolgsorgan Knochen und den umgebenden Weichteilen repräsentiert, die am makroskopischen Präparat, vor allem aber histopathologisch sichtbar werden. Dies gestattet die histopathologisch objektivierbare Zuordnung zur entsprechenden Erkrankungsphase der Osteomyelitis.

Bereits in der grundlegenden Frage der Einteilung der Osteomyelitis in eine akute und chronische Verlaufsform wird deutlich, dass ein stärker gewichteter histopathologischer Ansatz zur Lösung mancher unbeantworteter Fragen einen Beitrag leisten kann und auch sollte.

5.1. Akute und chronische Osteomyelitis

Einigkeit besteht in der Literatur in der Unterscheidung in eine akute und eine chronische Verlaufsform, lässt sie doch Rückschlüsse auf die zu erwartende Klinik, mögliche Erreger und über Therapiemöglichkeiten zu (Borens 2016). Keine Einigkeit besteht jedoch über die zeitliche Abgrenzung zwischen akut und chronisch und deren Kriterien.

Zimmerli und Trampuz unterschieden 2008 in frühe (< 2 Wochen), verzögerte (2 bis 10 Wochen) und chronische Osteomyelitis, Hofmann unterteilte 2004 nach

8 Wochen in eine akute und chronische Verlaufsform, wogegen Schmidt, Gentry 1988, Perry 1996 sowie Schnettler und Steinau 2004 bereits nach 4 Wochen von einer chronischen Osteomyelitis sprechen (Tiemann 2012).

In der vorliegenden Untersuchung traten Zeichen einer chronisch-floriden oder chronischen Osteomyelitis bereits nach einer Woche auf. Zeichen einer akuten Osteomyelitis bestanden von der 1. bis zur 6. Woche regelhaft, danach nur noch selten. Anhand der vorliegenden Daten lässt sich der Zeitpunkt der Chronifizierung einer Osteomyelitis nicht mit hinreichender Sicherheit belegen, jedoch bildet die Vorstellung, dass die chronische Osteomyelitis erst nach 4 bis 6 Wochen dem Stadium der akuten Osteomyelitis folgt, den tatsächlichen zeitlichen Verlauf offenbar nicht korrekt ab. Die abschließende Klärung dieser Frage war nicht Inhalt der Arbeit und sollte in zukünftigen Untersuchungen erfolgen. Die Einteilungskriterien des HOES könnten hierfür Grundlage sein.

➤ *Bereits nach 1 Woche können Zeichen einer chronischen Osteomyelitis auftreten.*

Die Häufigkeit des Auftretens der akuten und chronischen Osteomyelitis wird in der Literatur selten angegeben. In dieser Arbeit beträgt sie 1/3 für die akute und 2/3 für die chronische Osteomyelitis.

Die Diagnostik der Osteomyelitis beruht auf den Faktoren Anamnese, Labor, klinische Untersuchung, bildgebende Diagnostik, Erregerdiagnostik und feingewebliche Untersuchung (Tiemann 2012).

Soll die histopathologische Einschätzung nach dem HOES in den Mittelpunkt der Betrachtung gestellt werden, ist deren Verhältnis zu den anderen etablierten diagnostischen Methoden von Interesse.

5.2. Labordiagnostik

In der Labordiagnostik der Osteomyelitis sind die Entzündungsparameter C-reaktives Protein und Leukozytenzahl mit einer Sensitivität von etwa 90% aber niedriger Spezifität bezüglich einer Osteomyelitis etabliert. Für den CRP-Wert ist hier nicht nur der absolute Wert, sondern der Verlauf entscheidend (Wagner 2009).

Sowohl das eingriffsbezogen bestimmte C-reaktive Protein als auch die Leukozytenzahl zeigen in der vorliegenden Arbeit eine proportional-lineare Verteilung ihrer Mittelwerte zur Akuität des Entzündungsprozesses. Das gilt sowohl für die histopathologische Eingruppierung nach dem HOES als auch für die klinisch-makroskopischen Befundgruppen ($R^2 > 0,9$; $P < 0,05$).

5.3. *Mikrobiologie*

Es existiert eine Reihe von Problemen in der Diagnostik bakterieller Infektionen, die durch die mikrobiologische Diagnostik nicht adäquat zu lösen sind. Die Diagnostik von minimalen bakteriellen Infektionen (sog. „low-grade-Infektionen“) sind ebenso wie falsch-negative und falsch-positive mikrobiologische Befunde ein Problemfeld, dass sich mit zusätzlichen, histopathologisch definierten Kriterien lösen lässt (Krenn 2009). Nach wie vor stellt der mikrobiologische Erregernachweis aus in ausreichender Zahl gewonnenen, repräsentativen Gewebeproben den Goldstandard in der Osteomyelitisdiagnostik dar (Lew 2004).

Frommelt empfiehlt ein ideales Probenvolumen von 1 cm³ (Frommelt 2004). Entnommen werden sollten mindestens 3 bis 5 Gewebeproben aus repräsentativen Lokalisationen (Atkins 1998). Entscheidend ist der rasche Transport der Proben in das Untersuchungslabor, liegen doch insbesondere bei implantatassoziierten Infektionen häufig nur geringe Keimdichten planktonisch vorkommender Bakterien vor (Tiemann 2012).

In sessiler Wachstumsform im Biofilm persistierende Bakterien (Costerton 1978) entziehen sich der herkömmlichen Diagnostik, Trampuz empfiehlt deshalb generell die Sonikation (Ultraschallbehandlung) aller entnommenen Implantate, womit die Bakterien schonend aus dem Biofilm gelöst und in bis zu 90% kultiviert werden können (Renz 2016, Trampuz 2007). Die Langzeitkultivierung über 10 bis 14 Tage ist zum Nachweis auch geringer Keimquantitäten Standard. Auch zum Nachweis des SCV-Phänotyps ist die Langzeitkultivierung besser geeignet (Sendi 2010).

Wesentlich ist in jedem Fall die kritische Analyse der Plausibilität der Ergebnisse, insbesondere beim Verdacht auf eine Kontamination (Frommelt 2004), welche abhängig von der Art der Probengewinnung und -bearbeitung im Rahmen der Langzeitkultivierung und der Sonikation vermehrt auftreten.

Über die Mikrobiologie der bakteriellen Osteomyelitis gibt es kaum Veröffentlichungen (Zimmerli 2004, Walter 2009, Larsen 2012). Ein Konsens zur Definition und Interpretation falsch negativer oder falsch positiver Erregernachweise existiert nicht. Trampuz schlägt einen infektiologischen, an der Pathogenität der Erreger orientierten Lösungsansatz vor, indem einfach positive Erregernachweise für hochpathogene Erreger wie *Staphylococcus aureus* als richtig positive Befunde, für niedrigpathogene Bakterienspezies als falsch positive Befunde zu werten sind. Für niedrig pathogene Erreger werden mindestens 2 positive Erregernachweise gefordert (Renz 2016). Dies ist plausibel, bestimmt doch das Ausmaß der Pathogenität eines Bakterienstammes - seine Virulenz, wie viele Bakterien eines Typs benötigt werden, um eine Infektion im Wirt hervorzurufen.

Die Einschätzung des Therapieerfolges und die Entscheidung zur Implantation eines neuen Implantates nach erreichter Infektberuhigung hängen wesentlich von der Validität der mikrobiologischen Befunde ab. Die Anwendung des Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscores ist geeignet, die Plausibilität der mikrobiologischen Befunde objektiver zu bewerten. Dazu gehören die Einordnung der Pathogenität ebenso wie die Übereinstimmung des mikrobiologischen mit dem histopathologischen und dem klinischen Befund und die Einschätzung der Relevanz möglicher falsch positiver Befunde für die weitere Therapieplanung.

5.4. *Einschätzung der Pathogenität*

In der vorliegenden Arbeit wurden in 23% *Staphylococcus aureus* (n=95) und in 23% *Staphylococcus epidermidis* (n=93) nachgewiesen, gefolgt von *Propionibacterium acnes* in 12% (n=48) und *Enterococcus faecalis* in 8% (n=34). Es wurde die Verteilung dieser Erreger in den histopathologischen Diagnoseklassen nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) untersucht (Hypothese 5).

Staphylococcus aureus, ein hochpathogener, grampositiver Keim, ist der häufigste Erreger in der Entstehung der akuten posttraumatischen oder postoperativen Osteomyelitis.

Seine ausgeprägte Pathogenität gegenüber dem Knochen wird unter anderem mit der hohen Adhäsionsfähigkeit an Proteine der Knochenmatrix (Kollagen, Sialoprotein, Fibronectin, Laminin) erklärt (Herrmann 1988; Ryden 1989; Buxton 1990).

Virulenzfaktoren, Leukozidine und Prostaglandine bewirken die Zerstörung der ossären Struktur des Knochens. Folge sind in diesem Bereich auftretende Nekrosen und Sequestrationen (Sterret 1986, König 1995, Nair 1995). Bereits nach Stunden kommt es zur Ausbildung von Knochennekrosen, ausgehend von den Haver's- und Volkmann-Kanälen (Weiss 1989).

Staphylococcus epidermidis ruft als ein niedrig pathogener, koagulasenegativer Keim low grade Infektionen und chronische implantat- oder endoprothesenassoziierte Osteomyelitiden hervor. Durch Lektin und andere Adhäsine wird eine Adhäsion vor allem an Kunststoffoberflächen vermittelt. Einige Virulenzfaktoren sind weitgehend identisch mit denen von *S. aureus*. Änderungen der Virulenz und des Resistenzverhaltens gegen Antibiotika entstehen auch durch die spontane Veränderung von Bestandteilen der Zelloberfläche, die Phasenvariation (Christensen 1990).

Der Virulenzfaktor polysaccharide intercellular adhesin (PIA) wirkt als Mediator der interzellulären Adhäsion und schafft die Voraussetzungen für die Biofilmbildung dieses Erregers (Rupp 1999).

Bis zu 65 % aller bakteriellen Infektionen werden durch biofilmbildende Organismen verursacht (Stoodley 2011). *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* sind zugleich die häufigsten Erreger der akuten und chronischen Osteomyelitis und die am stärksten biofilmbildenden Bakterien (Sendi 2006). Gemeinsam mit dem häufig anzutreffendem *Pseudomonas aeruginosa* repräsentieren sie etwa 75% aller device- und implantatassoziierten Infektionen (McConoughey 2014). Auch *Propionibacterium acnes* ist zur Biofilmbildung in der Lage (Elias 2012).

Propionibacterium acnes ist ein langsam wachsender, niedrig pathogener, grampositiver Erreger, der sich topographisch überwiegend auf das obere Körperdrittel verteilt (Hsu 2016). Deshalb ist er vor allem bei endoprothesenassoziierten Infektionen des Schultergelenkes häufig anzutreffen. Erregerquelle ist die Subcutanschicht.

Enterococcus faecalis ist für etwa 90 % der durch Enterokokken verursachten Infektionen verantwortlich (Hahn 2009). Generell liegt die Virulenz der Enterokokken unter der von *Staphylococcus aureus*, Virulenzfaktoren sind Hämolysin und die aggregation substance (AS), ein Oberflächenadhäsion (Schlievert 1997). Häufig treten diese gramnegativen Erreger im Rahmen von Mischinfektionen und bei immunkompromittierten Patienten auf (Ceci 2015). Bedeutsam ist ihre potenzielle

Fähigkeit, Antibiotikaresistenzen auf andere Bakterienspezies zu transferieren und die Zunahme Vancomycin resistenter Stämme (VRE) (Sakka 2008, Anderson 2015).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen deutlich den Zusammenhang zwischen der Pathogenität der untersuchten Erreger und ihrer Verteilung in den histopathologischen Diagnoseklassen nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES):

1. Die Verteilung der Erreger ist charakteristisch für den jeweiligen Pathogenitätsgrad.
2. Es bestehen eine linear abfallende Verteilung für den hochpathogenen Erreger (*S. aureus*) sowie eine linear ansteigende Verteilung für niedrig pathogene Erreger (*S. epidermidis* und *P. acnes*) ($R^2 > 0.9$).
3. Bei mittlerer Pathogenität (*E. faecalis*) besteht eine annähernde Normalverteilung mit Maximum über dem chronisch-floriden Stadium.

Ziel weiterer Untersuchungen könnte sein, anhand zu entwickelnder normierter Kurvenverläufe (Nomogramm) eine Zuordnung der Bakterienspezies zum Grad ihrer Pathogenität zu ermöglichen.

- *Es existiert ein Zusammenhang zwischen Pathogenität des Erregers und Akuität der Osteomyelitis.*
- *Die Verteilung der Erreger ist charakteristisch für den jeweiligen Pathogenitätsgrad.*

5.5. Falsch negative und falsch positive Befunde

Häufig wird die Bedeutung des raschen Transportes in das Labor unterschätzt. Bereits nach 2 bis 4 Stunden sind bis zu einem Drittel der empfindlichen Erreger kulturell nicht mehr nachweisbar. Umgekehrt können Bakterien der Normalflora die ursächlichen Erreger überwuchern und eine falsche Infektionsursache vortäuschen (Mauch 2013).

Bekannt sind falsch negative Nachweisraten in der mikrobiologischen Kultivierung von 20 bis 30%, einige Autoren beschreiben sogar 10 bis 50% (Hungerer 2016).

Atkins wies 1998 nach, dass bei mindestens 3 positiven Erregernachweisen aus

5 bis 6 entnommenen Proben der positive Vorhersagewert für das Vorliegen einer Infektion 95% beträgt (Atkins 1998).

Die hohe Zahl an Nachweisen von *Staphylococcus epidermidis* und *Propionibacterium acnes* ist interpretationsbedürftig. Die Häufung insbesondere in den Gruppen, in denen kein Keimnachweis erwartet wird, „Zeichen einer abgelaufenen (beruhigten) Osteomyelitis“ und „Kein Anhalt für eine Osteomyelitis“, könnte

1. eingriffstechnische oder labortechnische methodische Ursachen haben: „Die Erreger sind gar nicht dort, wo wir sie vermuten, deshalb machen sie nichts“, sind also Kontaminanten oder
2. ihre Ursache in der Pathogenität haben: „Die Erreger sind dort, wo wir sie vermuten, machen aber nichts“ oder
3. „Beides trifft zu“.

Eine höhere Nachweisrate für *Staphylococcus epidermidis* und *Propionibacterium acnes* ist seit der Etablierung der Langzeitkultivierung über 14 Tage bekannt. Etwa 30% der Erregernachweise erfolgen erst nach dem 7. Tag (Schäfer 2008). *Propionibacterium acnes* benötigt durchschnittlich 8 Tage bis zum Nachweis (Günthard 1994). Basierend auf der aktuellen Literatur ist die Isolationsrate von *P. acnes* das beste Qualitätsmerkmal in der Kultivierung anaerober Kulturen (Larsen 2012).

Levi publizierte 2013 eine Isolationsrate für *P. acnes* von 41,5% aus Schultergelenkspunktaten und schloss daraus auf *P. acnes* als möglichen kausalen Erreger einer Schultergelenksosteoarthritis (Levy 2013). Maccioni et al. wiesen in intraoperativen Biopunkten der Gelenkkapsel nur noch 3,1% nach (Maccioni 2015).

In einer aktuellen prospektiven Untersuchung elektiver Schultereingriffe wurde in 40% mindestens ein positiver Erregernachweis für *P. acnes* geführt, ohne dass es in der Folge zu einer Infektion kam. Männer waren siebenmal häufiger betroffen als Frauen, dies entspricht in etwa der unterschiedlichen geschlechtsspezifischen Verteilung der Bakterienlast. Falconer schlußfolgerte, dass es sich bei *P. acnes* in vielen Fällen um einen aus der Subcutis freigesetzten Kontaminanten handeln könnte (Falconer 2016). In den vorliegenden Daten repräsentiert *P. acnes* 32% aller positiven Erregernachweise bei histopathologisch bestehenden Zeichen einer abgelaufenen (beruhigten) Osteomyelitis und 17% bei histopathologisch fehlendem Anhalt für eine Osteomyelitis. 41 Nachweise erfolgten bei Männern, 7 bei Frauen. Die geschlechtsspezifische Häufung spricht gegen einen methodischen Fehler. Es waren

17 von 48 Nachweisen einfach positiv, ein falsch positiver Nachweis im Sinne des Nachweises eines Kontaminanten ist in 33 % wahrscheinlich (16 einfach positive Nachweise von ≥ 3 Biopaten). In 20 Fällen trat er gleichzeitig mit anderen Erregern auf.

Die Zuordnung zu den Befundklassen nach dem HOES stützt die These von *P. acnes* als im OP-Feld verbreiteten Kontaminanten.

Ähnliches gilt für *Staphylococcus epidermidis*, welcher im infektberuhigten Stadium ein Viertel, im infektfreien Stadium sogar fast die Hälfte aller nachgewiesenen Erreger ausmacht. *Staphylococcus epidermidis* trat 29mal gleichzeitig mit anderen Erregern auf. Insgesamt waren 25 von 93 Nachweisen einfach positiv, ein falsch positiver Nachweis ist in 16 % wahrscheinlich (15 einfach positive Nachweise von ≥ 3 Biopaten).

Allerdings ist *S. epidermidis* zu 50% seines Vorkommens auch im akuten, chronisch-floriden und chronischen Osteomyelitisstadium anzutreffen, so dass seine Pathogenität nicht unterschätzt werden darf. Tan beschreibt für den zweizeitigen Hüftprothesenwechsel ein mehr als zweifach erhöhtes Reinfektrisiko bei intraoperativem Erregernachweis während der Reimplantation (Tan 2016).

➤ *Die Zuordnung zu den Befundklassen nach dem HOES stützt die These von *Propionibacterium acnes* als im OP-Feld verbreiteten Kontaminanten.*

Anhand der vorliegenden Daten können die folgenden Schlüsse gezogen werden:

1. Die intraoperativ gewonnenen, mikrobiologischen Befunde stimmen mit der erwarteten Zuordnung nach dem Histopathologischen Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) für die akute und floride Osteomyelitis (positiver mikrobiologischer Befund) zu 76%, für die Osteomyelitis ohne Infektanhalt (negativer mikrobiologischer Befund) zu 47% überein.
2. Die intraoperativ gewonnenen, mikrobiologischen Befunde stimmen mit der erwarteten Zuordnung zu den makroskopischen intraoperativen Befunden für die akute und floride Osteomyelitis zu 79%, für die Osteomyelitis ohne Infektanhalt stimmt sie zu 46% überein.
3. Die Anzahl der positiven mikrobiologischen Proben nimmt proportional zur Akuität in den Befundgruppen zu.

4. Die Rate der falsch negativen und falsch positiven mikrobiologischen Befunde liegt bei etwa 20%.

Der Stellenwert der in der vorliegenden Arbeit nicht untersuchten Aspekte des Vorkommens von Bakterien im Biofilm und als small colony variants (SCV) ist nicht zu vernachlässigen.

5.6. *Biofilm*

Wie wir seit der Entdeckung des Biofilms durch Costerton 1978 wissen, können Bakterien neben der planktonischen Lebensform, d.h. der Existenz als Einzelbakterium, auch als sessile Bakterienkolonien in einer durch sie selbst produzierten Polymermatrix (Glykokalix) mit herunterregulierten Stoffwechselvorgängen auch unter ungünstigen äußeren Bedingungen existieren. Diese genetisch gesteuerte, reversible Umwandlung in sessile Bakterienkolonien wird durch ein endogenes Signalsystem, die „Quorum-sensing“ Moleküle im Biofilm gesteuert. Angenommen wird, dass es sich hierbei um die phylogenetisch grundlegende natürliche Lebensform mit deutlichem Überlebensvorteil handelt (Wagner 2006).

Bakterien besitzen die hochentwickelte Fähigkeit zur Adhäsion an Oberflächen von Implantaten aus Kobalt-Chrom-Legierungen, Titanlegierungen, Polyäthylenoberflächen aber auch Knochenzement (PMMA).

Durch die Bakterien werden Extrazelluläre Polysaccharide (EPS) produziert und so auf der Oberfläche verankert. Es entstehen säulen- oder pilzförmigen Mikrokolonien (Costerton 1995), die durch mit Flüssigkeit gefüllte Kanäle voneinander getrennt sind, welche einen leichteren Zugang von Nährstoffen und einen effektiveren Abtransport von Stoffwechselprodukten ermöglichen (Davies 1998). Es besteht eine Zell-zu-Kommunikation, das „Quorum sensing“. Im Reifungsprozeß lagern in der Tiefe Bakterien mit stark herabregulierten Stoffwechselvorgängen und oberflächlich Bakterien in annähernd planktonischer Form, welche durch Scherkräfte oder durch eine Milieuveränderung aus der Kolonie herausgelöst werden können.

Im reifen, maturierten Biofilm sind Bakterien sowohl vor Umwelteinflüssen, den meisten Antibiotika und Toxinen weitgehend geschützt und entziehen sich der üblichen mikrobiologischen Diagnostik. Auch unter Hochdosis-Antibiotikatherapie kommt es häufig zum Überleben von sogenannten Persister-Zellen.

Der Erregernachweis in Biofilmen ist durch „Aufbrechen“ des Biofilms mittels Ultraschall (Sonikation) oder durch molekularbiologische Methoden wie der Polymerase- Kettenreaktion (PCR), Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und DNA-Mikroarrays möglich. Diese Verfahren wurden in der mikrobiologischen Aufarbeitung der Bioplate für die vorliegende Arbeit nicht angewandt. Insbesondere mithilfe der Sonikation ist eine höhere Sensitivität des Erregernachweises zu erwarten. Die damit einhergehende geringere Spezifität wird sich allerdings insbesondere in den Stadien mit reifem Biofilm, im chronisch-floriden, chronischen und infektaberuhigten Stadium der Osteomyelitis, auf die bereits hohe Rate falsch positiver Erregernachweise negativ auswirken.

Biofilmwirksam sind einige Antibiotika wie Rifampicin, Fosfomycin und Cubicin und Zytostatika wie Cisplatin, 5-Fluorocytosin und Mitomycin C.

5.7. *Small Colony Variants*

Staphylokokken (*S. aureus* und *S. epidermidis*) verfügen neben der Fähigkeit zur Biofilmbildung über eine weitere Überlebensstrategie im Wirt, die Bildung von small colony variants (SCV).

Small colony variants (SCV) von Staphylokokkenstämmen stellen eine natürlich vorkommende Subpopulation dar. Offenbar gehört die Verwandlung in den SCV-Phänotyp und zurück in den hochvirulenten, schnell wachsenden Wild-Typ zum normalen Lebenszyklus von Staphylokokken (Kahl 2014).

Dieser Phänotyp ist durch eine im Vergleich zu der Wildform atypische Morphologie der Kolonien auf dem Kulturmedium (geringere Pigmentierung und Hämolyse) und durch eine bis um den Faktor 103 verlangsamte Wachstumsrate charakterisiert. Die Kolonien haben somit einen deutlich kleineren Durchmesser und können als noch im Wachstum befindliche Kolonien fehlinterpretiert werden.

SCV entstehen durch eine reversible Änderung des Phänotyps aus der Bakterien-Wildform in eine auxotrophe Form (Defektmutante) für Thymidin, Menadion oder Hämin. Für Zellmetabolismus und Virulenz verantwortliche Faktoren werden herunterreguliert, wogegen Faktoren für intrazelluläre Persistenz und Biofilmbildung hochreguliert werden.

Ein metabolischer Defekt bewirkt die Erhöhung des Membranpotenzials und führt zu einer Störung der Elektronentransportkette, welche die oxidative Phosphorylierung

und ATP-Bildung beeinflusst (Proctor 2006). Hierbei spielt der streßmodulierende Transkriptionsfaktor SigB eine zentrale Rolle (Tuchscherr 2016).

Durch vermehrte Oberflächenexpression von fibronectin-binding Proteinen können SCV auch von Osteoblasten aufgenommen werden, wo sie über lange Zeiträume intrazellulär persistieren können (Vadaux 2006). Dies scheint ein wichtiger Faktor in der Pathogenese chronisch rekurrierender Osteomyelitiden mit über Jahre stummen Verläufen zu sein, entziehen sie sich doch dem Zugriff von Phagozyten und der Wirkung von Antibiotika (Sendi 2006). Bereits nach 12 Stunden intrazellulärer Persistenz erhöht sich die minimale Hemmkonzentration gegenüber Antibiotika (von Eiff 2001).

Die hohe Rate positiver Erregernachweise in der vorliegenden Arbeit, insbesondere in den Osteomyelitisstadien niedriger Akuität, d.h. ohne histomorphologisches Korrelat, ist mit dem Modell der SCV gut vereinbar.

Auslöser für die Entstehung der SCV ist möglicherweise ein hoher Selektionsdruck durch die Behandlung mit subtherapeutischen Antibiotikadosen z.B. bei der lokalen Antibiotikaaanwendung (PMMA-Gentamycinketten). Sendi et al. wiesen 2005 SCV bei Patienten mit endoprothesenasoziierten Infekten nach (Sendi 2006).

5.8. Klinischer Befund

Die klinische Einordnung des Infektionsstadiums bereitet für die hochakute Form in der Regel keine Schwierigkeiten, ist aber mit zunehmender Chronifizierung und vor allem für den „Low-Grade-Infekt“ schwierig (Walter 2009).

Entscheidend ist für den Großteil der mit der Osteomyelitis vertrauten Behandler die eigene klinische Einschätzung. Dabei unterscheidet deren persönliche Expertise, inwieweit die makroskopische Beurteilung des intraoperativen Befundes den tatsächlichen Infektstatus hinreichend abbildet.

Die Problemstellung, inwieweit wir unserer klinischen Einschätzung vertrauen dürfen und ob die histopathologische Eingruppierung nach HOES zu einer Objektivierung der Befunde führt, stand im Zentrum der vorliegenden Arbeit (Hypothese1).

Die Übereinstimmung der histopathologische Einschätzung anhand des Histopathologischen Osteomyelitis Scores (HOES) mit der klinisch-makroskopischen Einschätzung ist hoch. Die Treffergenauigkeit (accuracy) in den korrespondierenden Gruppen beträgt im Mittel 72,5%.

Die statistischen Gütekriterien belegen eine etwas höhere Genauigkeit der histopathologischen Einschätzung im Vergleich zur klinischen Einschätzung. In den korrespondierenden Befundgruppen bestehen ein positiver Vorhersagewert von 53%, eine Sensitivität von 40% und eine Spezifität von 84% für die HOES-Gruppen. Für die klinischen Befundgruppen wurden ein positiver Vorhersagewert von 40%, eine Sensitivität von 53% und eine Spezifität von 77% errechnet ($r_s = 0,581$, $P < 0,001$).

Durch die Anzahl der Zuordnungsmöglichkeiten in die histopathologischen und klinischen Befundgruppen ist der positive Vorhersagewert als Anteil der zutreffenden Zuordnung in der jeweiligen Befundgruppe erwartungsgemäß nicht sehr hoch. Er erhöht sich auf 83% nach HOES und 75% nach klinischem Befund, wenn die angrenzende Akuitätskategorie mit einbezogen wird. In der HOES-Gruppe „Zeichen einer akuten Osteomyelitis“ stimmten 94% der histopathologischen Einschätzung mit der kumulierten klinischen Einschätzung akuter Infekt (68%) und chronisch florider Infekt (27%) überein. Umgekehrt erhöhte sich die Übereinstimmung in der klinischen Gruppe „akuter Infekt“ mit der histopathologischen Einschätzung „Zeichen einer akuten Osteomyelitis“ (50%) und „Zeichen einer chronisch-floriden (also aktiven) Osteomyelitis“ (27%) auf 77%.

Die Gruppengrößen für die histopathologische oder klinische Zuordnung unterscheiden sich für die korrespondierenden Stadien z.T. deutlich. Für die klinische Gruppe „akuter Infekt“ (96 Fälle) besteht zur Gruppe „Zeichen einer akuten Osteomyelitis“ (71 Fälle) eine Differenz von 26%. Sie lassen eine Überinterpretation der Akuität der klinischen Befunde vermuten.

Für die implantatassoziierte, die endoprothesenassoziierte Osteomyelitis und die nicht implantat- oder endoprothesenassoziierte Osteomyelitis unterscheiden sich Treffergenauigkeit und positiver Vorhersagewert nicht signifikant.

Die Spearman-Korrelation r_s nimmt in den Altersgruppen 18 bis 45 Jahre, 41 bis 65 Jahre, über 65 Jahre tendenziell ab. Hier lässt sich ein nicht signifikanter Trend einer mit dem Alter zunehmenden Befunddivergenz beobachten ($P = 0,108$).

Von Interesse ist aber vor allem der Fall einer übereinstimmenden histopathologischen und klinischen Beurteilung. Die Spezifität in den korrespondierenden Befundgruppen ist mit 84% für die Eingruppierung nach HOES und 77% für die klinische Eingruppierung hoch.

Im Falle der Befundübereinstimmung von histopathologischer und klinischer Einschätzung - also im Mittel in 72,5% der Fälle - ist mit einer Spezifität von 84% von einer richtigen Diagnosestellung auszugehen. Das legt nahe, dass nicht die Einzelbeurteilung, sondern nur die Kombination von klinischer und histopathologischer Beurteilung zielführend ist.

Die Einbeziehung der Variablen „mikrobiologischer Befund“ in die klinische Beurteilung führt zu keiner Änderung der statistischen Gütekriterien für die Befundübereinstimmung (Hypothese5; $r_s = 0,559$; $P < 0,001$). Die statistische Aussage gilt also unabhängig von der Kenntnis des mikrobiologischen Befundes oder dessen Richtigkeit (falsch negativ oder falsch positiv).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen:

- *Stimmen die histopathologische Einschätzung und die klinisch-makroskopische Einschätzung überein, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit (84%) von einer richtigen Diagnosestellung auszugehen ($r_s = 0,581$, $P < 0,001$).*
- *Die Treffergenauigkeit (accuracy) für die Übereinstimmung der Zuordnung beträgt 72,5%.*
- *Nicht die Einzelbeurteilung, sondern die Kombination aus klinischer und histopathologischer Beurteilung führen zu einer sicheren Diagnosestellung.*

5.9. Vergleich mit den Ergebnissen der Untersuchung aus dem Jahr 2014.

Im Jahr 2014 wurde der Histopathologische Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) evaluiert und publiziert (Tiemann 2014).

Es wurde die Übereinstimmung der histopathologischen Einordnung in die 5 Befundgruppen nach HOES mit der klinischen Eingruppierung nach makroskopisch-intraoperativem Befund in die 5 Gruppen „Akute Infektion“, „Chronisch-floride

Infektion“, „Chronische Infektion“, „Beruhigte Infektion“, „Keine Infektion“ durch Addition der absoluten prozentualen Übereinstimmung der 5 korrespondierenden Gruppen untersucht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen mit 67% Übereinstimmung die 2014 erhobenen Daten mit einer Übereinstimmung von 68%.

Die Übereinstimmung der histopathologischen Befunde nach HOES mit den mikrobiologischen Befunden beträgt aktuell 69% (2014 57%), der intraoperativen makroskopischen Befunde mit den mikrobiologischen Befunden 66% (2014 74%).

➤ *Der Histopathologische Osteomyelitis-Score (HOES) führt zu einer Objektivierung der Diagnosestellung*

6. Schlußfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass die Sensitivität der Einzelbeurteilungen – sowohl der klinischen, als auch der histopathologischen Beurteilung - niedrig ist, sich aber durch deren Kombination eine hohe Aussagekraft von 84% erreichen läßt.

Für die Bewertung des Therapieerfolges und für die Therapieplanung darf die alleinige klinische Beurteilung nicht überschätzt werden, eine histopathologische Probengewinnung und die Einbeziehung des Ergebnisses in die Befundbewertung ist in jedem Fall zu empfehlen.

Schlußfolgernd aus der hohen Zahl falsch positiver Erregernachweise ohne histopathologisches Substrat muß die Relevanz dieser mikrobiologischen Befunde für die Therapie kritisch gesehen werden. Auch in diesen Fällen kann die histopathologische Beurteilung wegweisend für weitere Therapieentscheidungen sein und sie effektiver gestalten.

7. Anhang

7.1. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen Seite

Abbildungen

Abb.1:	Die Waldvogel–Klassifikation bezieht sich auf Ätiologie und die lokale Situation	5
Abb.2:	Die Klassifikation von Cierny und Mader beschreibt die knöcherne Situation anhand der anatomischen Lokalisation und schließt den klinischen Zustand des Patienten mit ein.	5
Abb.3:	Die Einteilung der chronischen Osteomyelitis nach Hofmann ist pathophysiologisch orientiert.	6
Abb.4:	Der Osteomyelitis–Diagnose-Score gestattet die Bewertung der Diagnosesicherheit für die Osteomyelitis in Diagnoseklassen A-C. Zum Erreichen der Diagnoseklasse A sind mindestens 3 Parameter erforderlich (Schmidt 2011).	10
Abb.5:	Die für die entsprechenden Erkrankungsphasen typischen Befunde werden entsprechend ihres Ausprägungsgrades (0-3) gewichtet. Das führt zur Einordnung in die entsprechenden Diagnoseklassen 1-5 (Tiemann et al. 2014).	12
Abb.6:	Eingriffslokalisierung prozentual	15
Abb.7:	Der intraoperative makroskopische ossäre und Weichteilbefund wird im „Begleitbogen septische Chirurgie“ erfaßt.	19
Abb.8:	Algorithmus der bildgebenden Diagnostik der Osteomyelitis (Braunschweig 2016)	21
Abb.9:	Mikrobiologische Diagnostik Links: BBL Thioglycollate Bouillon-Medium, angereichert mit Vitamin K1 und Hämin Mitte: Einweg-Homogenisier-system ULTRA-TURRAX® Tube Drive control Rechts: BD Columbia Agar mit 5% Schafblut (Platte li.); BD Schaedler-Agar mit Vitamin K1 und 5 % Schafblut (Platte re.) ...	22
Abb.10:	Kultivierung und Resistenzbestimmung Links: Kultivierung im „Anaerobiertopf“ mit 2 Kulturmedien über 2 Wochen	

	Rechts: Resistenzbestimmung mittels Karte in Mikrodilutionstechnik (System Vitek 2, Firma bioMérieux)	24
Abb.11:	Histopathologische Kriterien der Osteomyelitis (Krenn 2012)	28
		Seite
Abb.12:	HOES-Tabellarische Form. Nach Befundausprägung werden 0 bis 9 Punkte für die Kriterien „akut“ A(0-9) und 0 bis 6 Punkte für die Kriterien „chronisch“ C(0-6) vergeben.	29
Abb.13:	Durch die semiquantitative und numerische Bewertung ergibt sich der HOES in der schriftlichen Form	29
Abb.14:	Kortikales (1) sowie spongiöses (2) Knochengewebe mit intra- medullären Granulo-zytenansammlungen (3), Makrophagen (4) sowie Markraumödem (5) entsprechend einer bakteriellen Infektion. HOES: Zeichen einer akuten Osteomyelitis	30
Abb.15:	Knochengewebe mit intramedullären Granulozytenakkumulaten(1), Plasmazellakkumulaten (2) sowie von kleinherdigen Nekrosen (3) HOES: Zeichen einer chronisch floriden, also aktiven Osteomyelitis ..	30
Abb.16:	Geflecht-knochengewebe mit ausge-prägter Fibrose (1), minimale intramedulläre Makrophagenakkumulate. HOES: Zeichen einer chronischen Osteomyelitis	30
Abb.17:	reaktive Knochenneubildung (1), Markraumfibrose (2), Markraum- ödem (3), minimaler Nachweis von Makrophagen (4). HOES: Zeichen einer abgelaufenen, beruhigten Osteomyelitis	30
Abb.6:	Eingriffslokalisation prozentual	33
Abb.18:	Verteilung der Fälle in den Befundgruppen nach HOES	34
Abb.19:	Anzahl der Erregernachweise	34
Abb.20:	Erregerspektrum in 491 Eingriffen	35
Abb.21:	Übereinstimmung der Gruppengrößen und ihrer stadiengerechten Zuordnung	36
Abb.22:	Zuordnungshäufigkeit HOES nach Implantat	41
Abb.23:	Zuordnungshäufigkeit HOES nach Altersgruppen	42
Abb.24:	positive und negative Erregernachweise in den HOES-Gruppen; (grün hinterlegt Erwartung 100%)	46

Abb.25:	Mittelwertverteilung positiver mikrobiologischer Proben in den HOES-Gruppen ($R^2= 0,99$ in Gruppen 1-4, bei Einbeziehung der Gruppe "kein Anhalt für OM" $R^2=0,85$)	47
		Seite
Abb.26:	positive und negative Erregernachweise in den den klinisch-makroskopischen Befundgruppen; (grün hinterlegt Erwartung 100%)	50
Abb.27:	Die Mittelwerte der Anzahl positiver mikrobiologischer Proben in den klinischen Gruppen (Gruppe 1= akuter Infekt, Gruppe 2= chronisch - florider Infekt, Gruppe 3= infektberuhigt mit Residuen) sind linear verteilt ($R^2= 0,99$ in Gruppen 1-3, bei Einbeziehung der Gruppe4="makr.infektfrei" $R^2=0,85$).....	51
Abb.28:	Die Selektion der Fälle mit erwartetem mikrobiologischem Befund führt zu keiner Änderung der statistischen Gütekriterien.	53
Abb.29:	Die Häufigkeit des Auftretens von Staphylococcus aureus (S.a.) und Staphylococcus epidermidis (S.e.) in den HOES-Gruppen ist linear verteilt (R^2 =Bestimmtheitsmaß, S.a. $R^2=0,964$; S.e. $R^2=0,884$; bei Einschluß der HOES-Gruppe „Kein Anhalt für Osteomyelitis“ S.a. $R^2=0,926$.; S.e. $R^2=0,812$).	55
Abb.30:	Die Verteilung der Erreger ist charakteristisch für den jeweiligen Pathogenitätsgrad.	56
Abb.31:	Propionibacterium acnes (P.a) wird häufig einfach positiv nachgewiesen (grüner Balken).	56
Abb.32:	Die CRP-Mittelwerte in den HOES-Gruppen (Gruppe 1= akute OM, Gruppe 2= chronisch -floride OM, Gruppe 3= chronische OM, Guppe4=abgelaufene OM) sind linear verteilt ($R^2= 0,994$).	59
Abb.33:	Die Mittelwerte der Leukozytenzahl in den HOES-Gruppen (Gruppe 1= akute OM, Gruppe 2= chronisch -floride OM, Gruppe 3= chronische OM, Guppe 4=abgelaufene OM) sind linear verteilt ($R^2= 0,932$).	59
Abb.34:	Die CRP-Mittelwerte in den klinischen Gruppen (Gruppe 1= akuter Infekt, Gruppe 2= chronisch -florider Infekt, Gruppe 3= infektberuhigt mit Residuen) sind linear verteilt ($R^2= 0,951$).	59
Abb.35:	Die Mittelwerte der Leukozytenzahl in den klinischen Gruppen (Gruppe 1= akuter Infekt, Gruppe 2= chronisch -florider Infekt, Gruppe 3= infektberuhigt mit Residuen) sind linear verteilt ($R^2= 0,960$).	59
Abb.36:	zeitliches Auftreten akute und chronische Osteomyelitis	60

Abb.37:	Bestimmung der Infektdauer für offene und geschlossene Frakturen und Prothesen	61
---------	--	----

Seite

Tabellen

Tab 1:	Entität nach Implantat	33
Tab. 2:	Die Statistischen Gütekriterien belegen eine höhere Genauigkeit der histopathologischen Einschätzung	41
Tab.3:	Der Vergleich der 3 Alterskategorien zeigt eine abnehmende Stärke des Zusammenhanges (Spearman K) und eine mit dem Alter abnehmende Genauigkeit der Testverfahren (keine Signifikanz)	44
Tab.4:	Der Vergleich der 3 Alterskategorien zeigt auch implantatassoziiert eine abnehmende Stärke des Zusammenhanges (Spearman K) (keine Signifikanz)	44
Tab.5:	Erregernachweise in den HOES-Gruppen	46
Tab.6:	falsch negativer Erregernachweis in den HOES -Gruppen mit hoher Akuität	48
Tab.7:	falsch positiver Erregernachweis in den HOES -Gruppen mit geringer Akuität	48
Tab.8:	Erregernachweise in den klinisch-makroskopischen Gruppen	50
Tab.9:	falsch negativer Erregernachweis in den klinischen Gruppen mit hoher Akuität	52
Tab.10:	falsch positiver Erregernachweis in den klinischen Gruppen mit geringer Akuität	52
Tab.11:	Erregerverteilung in den HOES-Gruppen	57
Kontingenztabelle 1:	Häufigkeit des Auftretens der Befundgruppen nach HOES und nach klinisch intraoperativer Beurteilung für 491 Eingriffe.	37
Kontingenztabelle 2:	li.: histopathologische vs. klinische Übereinstimmung re.: klinische vs. histopathologische Übereinstimmung	40
Kontingenztabelle 3-5:	Altersgruppenbezogenes Auftreten der Befundgruppen	43
Kontingenztabelle 6:	Selektierte Darstellung der Fälle mit erwartungsgemäßigem Erregernachweis (oben)	53

7.2. Datensatzstruktur

Erfasst wurden:

1. Laufende Nummer des Datensatzes
2. Patientennummer
3. Geburtsdatum
4. Geschlecht
5. Datum der Operation
6. Laborwert: CRP
7. Laborwert: Leukozytenzahl
8. Intraoperativer makroskopischer Befund Knochen
9. Intraoperativer makroskopischer Befund Weichteile
10. Anzahl der Mikrobiologischen Proben
11. Anzahl der positiven Mikrobiologischen Befunde
12. Keimspektrum
13. Mikrobiologischer Nachweis Staphylococcus aureus
14. Mikrobiologischer Nachweis Staphylococcus epidermidis
15. Mikrobiologischer Nachweis Staphylococcus spezie
(gemeinsame Erfassung Staphylococcus capitis
 Staphylococcus hominis
 Staphylococcus lentus
 Staphylococcus lugdunensis
 Staphylococcus warneri)
16. Mikrobiologischer Nachweis Streptokokken
17. Mikrobiologischer Nachweis Enterococcus faecalis
18. Mikrobiologischer Nachweis Enterococcus faecium
19. Mikrobiologischer Nachweis Enterobacter cloacae
20. Mikrobiologischer Nachweis Escherichia coli
21. Mikrobiologischer Nachweis Pseudomonas aeruginosa
22. Mikrobiologischer Nachweis Clostridien
23. Mikrobiologischer Nachweis Propionibacterium acnes
24. Mikrobiologischer Nachweis Finegoldia magna
25. Mikrobiologischer Nachweis Andere

26. Histologie Eingangsnummer
27. Histologie Befunddatum
28. Befund HOES A1 (Knochen-Nekrose) semiquantitativ
29. Befund HOES A2 (Weichgewebs-Nekrose) semiquantitativ
30. Befund HOES A3 (Granulozyten-Infiltrat) semiquantitativ
31. Befund HOES C1 (Knochenneubildung/Fibrose) semiquantitativ
32. Befund HOES C2 (Lymphozyten-/Makrophagen-Infiltrat) semiquantitativ
33. Summe HOES A1-3
34. Summe HOES C1-2
35. Befund HOES schriftliche Form
36. Klinische Diagnose
37. Lokalisation
38. Nebenerkrankungen
39. Datum Unfall
40. Datum Prothesenimplantation
41. Datum Osteosynthese
42. Datum Infektbeginn
43. Infektdauer vor aktueller Operation
44. Offene Fraktur

7.3. Literaturverzeichnis

Anderson 2015

Anderson AC, Jonas D, Huber I, Karygianni L, Wölber J, Hellwig E, et al. Enterococcus faecalis from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. *Front Microbiol.* 2015;6:1534.

Atkins 1998

Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, Crook DW, Simpson H, Peto TE, McLardy-Smith P, Berendt AR. Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group. *J Clin Microbiol.* 1998 Oct;36(10):2932-9.

Borens 2016

Borens O, Helmy N. Infizierte Osteosynthese. *Chirurg.* 2016;87:822-830.

Buxton 1990

Buxton TB et al. Binding of a Staphylococcus aureus bone pathogen to type I collagen. *Microb Pathog.* 1990;8:441-448.

Braunschweig 2016

In: Tiemann AH (Hrsg.). Muskuloskelettale Infektionen. Handlungsleitfaden für Diagnostik und Therapie. De Gruyter, Berlin/Boston. 2016;S.11, ISBN 978-3-11-047315-5

Calhoun 2009

Calhoun JH, Manring MM, Shirliff M. Osteomyelitis of the Long Bones. *Semin Plast Surg.* 2009; 23(2):59–72.

Ceci 2015

Ceci M, Delpech G, Sparo M, Mezzina V, Sánchez Bruni S, Baldaccini B. Clinical and microbiological features of bacteremia caused by Enterococcus faecalis. *J Infect Dev Ctries.* 2015 Nov 30; 9 (11):1195-203.

Christensen 1990

Christensen GD, Baddour LM, Madison BM, Parisi JT, Abraham S, Hasty DL, Lowrance JH, Josephs JA, Simpson WA. Colonial morphology of staphylococci on Memphis agar: phase variation of slime production, resistance to beta-lactam antibiotics, and virulence. *J Infect Dis.* 1990;161:1152-1169.

Costerton 1978

Costerton JW, Geesey GG, Cheng K-J. How bacteria stick. Sci Am. 1978; 238:86-95.

Costerton 1995

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin SH. Microbial biofilms.

Annu Rev Microbiol. 1995; 49:711-745.

Cierny 1985

Cierny G, Mader JT, Penninck JJ. A clinical staging system for adult osteomyelitis. Contemp Orthop. 1985; 10:17-37.

Davies 1998

Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science. 1998;280:295-298.

Diefenbeck 2003

Diefenbeck M, Hofmann GO. Behandlungsstrategie beim Frühinfekt nach operativer Frakturversorgung. Trauma und Berufskh. 2003;(2)

Elias 2012

Elias S, Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. FEMS Microbiol Rev. 2012 Sep;36(5):990-1004. Epub 2012 Feb 2.

Günthard 1994

Günthard H, Hany A, Turina M, Wu J. (1994). Propionibacterium acnes as a cause of aggressive aortic valve endocarditis and importance of tissue grinding: case report and review. J Clin Microbiol. 1994; 32:3043–3045.

Falconer 2016

Falconer TM, Baba M, Kruse LM, Dorrestijn O, Donaldson MJ, Smith MM, Figtree MC, Hudson BJ, Cass B, Young AA. Contamination of the Surgical Field with Propionibacterium acnes in Primary Shoulder Arthroplasty. J Bone Joint Surg Am. 2016 Oct 19;98(20):1722-1728.

Flückiger 2001

Flückiger U, Zimmerli W. Osteomyelitis. SchweizMedForum. 2001; 6:133-137.

Frommelt 2004

Frommelt L. Antibiotikatherapie. In: Schnettler R, Steinau HU (Hrsg) Septische Knochenchirurgie. Thieme, Stuttgart. 2004; ISBN 3-13-116981-8

Hahn 2009

Hahn H. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer Verlag. 2009; 6: 223, ISBN 978-3-540-46359-7.

Herrmann 1988

Herrmann M. Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. J Infect Dis. 1988; 158:693-701.

Hofmann 2004:

Hofmann GO. Infektionen der Knochen und Gelenke. Urban und Fischer. München. 2004; ISBN: 3-437-23400-5

Hsu 2016

Hsu JE, Bumgarner RE, Matsen FA 3rd. Propionibacterium in Shoulder Arthroplasty: What We Think We Know Today. J Bone Joint Surg Am. 2016;98(7):597-606.

Hungerer 2016

Hungerer S, Morgenstern M, Militz M, Bühren V. in: Biberthaler P, van Griensven M (Hrsg). Knochendefekte und Pseudarthrosen. Springer-Verlag. 2016; Kap.8:116; ISBN 3642449913, 9783642449918

Kahl 2014

Kahl BC. Small colony variants (SCV) of Staphylococcus aureus—a bacterial survival strategy. Infect Genet Evol. 2014 Jan;21:515-22. doi: 10.1016/meegid.2013.05.016.

König 1995

König B, Prevost G, Piemont Y, König W. Effects of Staphylococcus aureus leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes. J Infect Dis. 1995; 171:607-613.

Krenn 2009

Krenn V, Rüther W. Orthopädische Pathologie. Orthopäde. 2009;38:483-483.

Krenn 2011

Krenn V. Editorial: Orthopädische Pathologie. Pathologe. 2011; 32(3):181

Krenn 2012

Krenn V, Rüther W (Hrsg.). Pathologie des Bewegungsapparates. De Gruyter Berlin. ISBN 978-3-11-028596-3.

Larsen 2012

Larsen LH, Lange J, Xu Y, Schönheyder HC. Optimizing culture methods for diagnosis of prosthetic joint infections: a summary of modifications and improvements reported since 1995. *Journal of Medical Microbiology*. 2012; 61: 309–316.

Levy 2013

Levy O, Iyer S, Atoun E, Peter N, Hous N, Cash D, Musa F, Narvani AA. *Propionibacterium acnes*: an underestimated etiology in the pathogenesis of osteoarthritis?. *J Shoulder Elbow Surg*. 2013 Apr; 22(4):505-11. doi: 10.1016/j.jse.2012.07.007. Epub 2012 Sep 13.

Lew 2004

Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet*. 2004; 364: 369-379.

Ludwig 1983

Ludwig R, Lohse H, Röhr M. Statistische Verfahren. Statistik für Soziologen, Psychologen, Pädagogen und Mediziner. Band 2. Verlag Harry Deutsch, Thun und Frankfurt am Main 1983; ISBN 978-3871445965.

Maccioni 2015

Maccioni CB, Woodbridge AB, Balestro JC, Figtree MC, Hudson BJ, Cass B, Young AA. Low rate of *Propionibacterium acnes* in arthritic shoulders undergoing primary total shoulder replacement surgery using a strict specimen collection technique. *J Shoulder Elbow Surg*. 2015;24(8):1206-11. doi: 10.1016/j.jse.2014.12.026. Epub 2015 Feb 17.

Mader 1997

Mader JT, Shirliff M, Calhoun JH. Staging and staging applikation in Osteomyelitis. *Clinical Infectious Diseases* 1997;25:1303-9.

Mauch 2013

Mauch H, Stetzelberg H, Roth A. in: Adam W, Doerr HW, Link H, Lohde H (Hrsg.). *Die Infektiologie*. Springer-Verlag. 2013; Kap. 4: 55. ISBN 3642185770, 9783642185779.

McConoughey 2014

McConoughey SJ, Granger JF, Manning MM, Calhoun JH, Shirliff M, Kathju S, Stoodley P. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol*. 2014; 9(8):987-1007.

Nair 1995

Nair S et al. Surface-associated proteins from *Staphylococcus aureus* demonstrate potent bone resorbing activity. *J Bone Miner Res*. 1995; 10:726-734.

Procter 2006:

Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4:295-305.

Renz 2016

Renz N, Müller M, Perka C, Trampuz A. Implantatassoziierte Infektion-Diagnostik. *Chirurg*. 2016; 87:813-821.

Rupp 1999

Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Mack D. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *Infect Immun*. 1999;67:2656-2659.

Ryden 1989:

Ryden C. Specific binding of bone sialoprotein to *Staphylococcus aureus* isolated from patients with osteomyelitis. *Eur J Biochem*. 1989; 184:331-336.

Sakka 2008

Sakka V, Tsiodras S, Galani L. Risk-factors and predictors of mortality in patients colonised with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14(1):14-21.

Schäfer 2008

Schäfer P, Fink B, Sandow D, Margull A, Berger I, Frommelt L. Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. *Clin Infect Dis*. 2008; 47: 1403–1409.

Schlievert 1997

Schlievert PM, Gahr PJ, Assimacopoulos AP, Dinges MM, Stoeckl JA, Harmala JW, Hirt H, Dunne GM.

Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. *Infect Immun*. 1998; 66:218-223.

Schmidt 2011

Schmidt HGK, Tiemann AH, Braunschweig R, Diefenbeck M, Bühler M, Abitzsch D, Haustedt N, Walter G, Schoop R, Heppert V, Hofmann GO, Glombitza M, Grimme C, Gerlach UJ, Flesch I. Definition of the Diagnosis Osteomyelitis – Osteomyelitis Diagnosis Score (ODS). *Z Orthop Unfall*. 2011; 149(4): 449-460.

Sendi 2006

Sendi P, Rohrbach M, Graber P, Frei R, Ochsner PE, Zimmerli W. Staphylococcus aureus small colony variants in prosthetic joint infection. Clin Infect Dis. 2006;43:961-7.

Sendi 2010

Sendi P, Frei R, Maurer T B, Trampuz A, Zimmerli W, Graber P. Escherichia coli variants in periprosthetic joint infection: diagnostic challenges with sessile bacteria and sonication. J Clin Microbiol. 2010; 48: 1720–1725.

Sterrett 1986

Sterrett JD. The osteoclast and periodontitis. J Clin Periodontol. 1986; 13:258-269.

Stoodley 2011

Stoodley P, Ehrlich GD, Sedghizadeh PP, Hall-Stoodley L, Baratz ME, Altmann DT, Sotereanos NG, Costerton JW, Demeo P. Orthopedic biofilm infections. CurrOrtopPract. 2011 Nov;22(6):558-63.

Tan 2016

Tan TL, Gomez MM, Manrique J, Parvizi J, Chen AF. Positive Culture During Reimplantation Increases the Risk of Subsequent Failure in Two-Stage Exchange Arthroplasty. J Bone Joint Surg Am. 2016 Aug 3;98(15):1313-9.

Tiemann 2011

Tiemann AH. Infektiöse Erkrankungen des Bewegungsapparates. In: Krenn V, Rütther W(Hrsg). Pathologie des Bewegungsapparates. De Gruyter, Berlin. 2011; ISBN 978-3-11-028569-3.

Tiemann 2012

Tiemann AH, Braunschweig R, Hofmann GO. Knocheninfektionen. Unfallchirurg. 2012;115(6):480-488.

Tiemann 2014

Tiemann AH, Hofmann GO, Krukemeyer MG, Krenn V, Langwald S. Histopathologischer Osteomyelitis-Evaluationsscore (HOES) – ein innovativer Ansatz zur histopathologischen Diagnostik und Kartierung der Osteomyelitis. GMS Interdiscip Plast Reconstr Surg DGPW. 2014; 3-08.

Trampuz 2007

Trampuz A, Pieper KE, Jacobson MJ et al. Sonication of removed hip and knee prosthesis for diagnosis of infection. N Engl J Med. 2007; 357:654-663.

Tuchscherer 2016

Tuchscherer L, Löffler B. Staphylococcus aureus dynamically adapts global regulators and virulence factor expression in the course from acute to chronic infection. Curr Genet. 2016 Feb;62(1):15-7. doi: 10.1007/s00294-015-0503-0. Epub 2015 Jun 30.

Vadaux 2006

Vadaux P, Kelley WL, Lew DP. Staphylococcus aureus Small Colony Variants: Difficult to Diagnose and Difficult to Treat. Clin Infect Dis. 2006; 43(8):968-970.

Von Eiff 2001

Von Eiff C, Becker K, Metze D, et al. Intracellular persistence of Staphylococcus aureus small-colony variants within keratinocytes: a cause for antibiotic treatment failure in a Patient with Darier's disease. Clin Infect Dis. 2001;32:1643-7.

Waldvogel 1970

Waldvogel FA, Medoff G, Swartz MN. Osteomyelitis—a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. 3: osteomyelitis associated with vascular insufficiency. N Engl J Med. 1970;282:198-206.

Walter 2009

Walter G, Hirschberger W, Hoffmann R. Mikrobiologie bei Osteitis. Evidenzbasierte Medizin. Trauma Berufskrankh. 2009;11(2):187-192.

Wagner 2006

Wagner C, Hänsch GM, Wentzensen A, Heppert V. Die implantatassoziierte posttraumatische Osteitis. Unfallchirurg. 2006;109:761-769.

Wagner 2009

Wagner F. Laboruntersuchungen zur Osteitisdiagnostik. Trauma Berufskrankh. 2009; 11(2):184-186

Weiss 1989

Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. N Engl J Med. 1989 Feb 9;320(6):365-376.

Zimmerli 2004

Zimmerli W, Flückiger U. Verlaufsformen und Mikrobiologie der bakteriellen Osteomyelitis. Orthopäde. 2004;33:267-272.

7. 4. Lebenslauf

Aus Gründen des Datenschutzes ist der Lebenslauf in der elektronisch veröffentlichten PDF-Version nicht verfügbar.

7.5. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der FriedrichSchiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Dr. G.O. Hofmann,

Prof. Dr. Dr. R.Ludwig

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und

dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Datum

Unterschrift

7.6. Danksagung

Die vorliegende Dissertationschrift würde ohne die Unterstützung meiner Frau Kathrin nicht existieren. Ich danke Dir von ganzem Herzen dafür, das Du immer für mich da bist.

Mein Dank gilt besonders Herrn Professor Dr. Dr. Hofmann als meinem Betreuer. Sie haben mich stets unterstützt und mir Ihre wertvolle Zeit geopfert.

Nicht minder danken möchte ich Herrn Professor Dr. Tiemann, dem ich nicht nur die thematische Grundlage, sondern vor allem meine Kenntnisse in der septisch - rekonstruktiven Chirurgie verdanke.

Herzlich danken möchte ich Herrn Professor Dr.Dr. Ludwig für die Einblicke in die Statistik, die sich mir bei unserer gemeinsamen Arbeit eröffnet haben.